

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 6

Contribution à l'Étude de la Réaction de Gram

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue

PAR

Raymond DELÉTANG

Pharmacien.

Chef de Laboratoire à la Maternité de l'Hôpital Tenon.
Moniteur des Travaux pratiques de Cryptogamie-Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie.

JURY { MM. LUTZ, Président.
BACH, Professeur.
MASCRÉ, Agrégé.

PARIS

LES PRESSES MODERNES
7, RUE DE BEAUJOLAIS.

1933

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 6

Contribution à l'Etude de la Réaction de Gram

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue

PAR

Raymond DELÉTANG

Pharmacien.

Chef de Laboratoire à la Maternité de l'Hôpital Tenon.
Moniteur des Travaux pratiques de Cryptogamie-Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie.

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
MASCRÉ, *Agrégé.*

PARIS

LES PRESSES MODERNES

7, RUE DE BEAUJOLAIS.

1933

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. P. GUÉRIN, Doyen, O. ✱, 🌿 I.
 P. LEBEAU, Assesseur, O. ✱, 🌿 I.
 P. DESPORT, Secrétaire, ✱, 🌿 I.

Professeurs

MM. GUÉRIN, O. ✱, 🌿 I. Botanique générale.
 BÉHAL, Membre de l'Institut,
 G. O. ✱, 🌿 I. Chimie organique.
 PERROT, O. ✱, 🌿 I. Histoire naturelle des Médicaments.
 COUTIERE, O. ✱, 🌿 I. Zoologie.
 LEBEAU, O. ✱, 🌿 I. Pharmacie chimique.
 BOUGAULT, ✱, 🌿 I. Chimie analytique.
 GORIS, ✱, 🌿 I. Pharmacie galénique.
 TASSILLY, O. ✱, 🌿 I. Physique.
 DAMIENS, ✱, 🌿 I. Chimie minérale.
 HÉRISSEY, O. ✱, 🌿 I. Chimie biologique.
 SOMMELET, ✱, 🌿 I. Hydrologie et Hygiène.
 LUTZ, ✱, 🌿 I. Cryptogamie et Microbiologie.
 FABRE, ✱, 🌿 I. Toxicologie.
 LAUNOY, O. ✱, 🌿 I. Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O. ✱, 🌿 I.

Professeurs Honoraires : MM. DELÉPINE, O. ✱, 🌿 I.
 GUERBET, ✱, 🌿 I.

Chargés de cours

MM. Marc HONCRAT, ✱,
 🌿 I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
 LAUNOY, O. ✱, 🌿 I. Pharmacodynamie.
 DELABY, ✱, 🌿 I. Minéralogie.
 PICON, 🌿 I. Chimie minérale.
 BACH, 🌿 I. Microbiologie.

Agrégés en exercice

MM. DELABY ✱, 🌿 A.	MM. MASCRÉ, 🌿 I.	MM. BEDEL, 🌿 I.
PICON, 🌿 I.	FLEURY, 🌿 I.	RÉGNIER, 🌿 I.
	BACH, 🌿 I.	

Chefs des travaux pratiques

MM. BEDEL, 🌿 I., *agré* chargé des
 T. P. de 1^{re} année Chimie générale.
 FLEURY, 🌿 I. et RÉGNIER, 🌿 I.,
 *agré*s, chargés des travaux de Chimie analytique.
 SOUÈGES, 🌿 I. Micrographie.
 LEROUX, 🌿 I. Physique.
 DEVAL, ✱, 🌿 I. Microbiologie.
 DELABY, ✱, 🌿 I., PICON, 🌿 I.
 et MASCRÉ, 🌿 I., *agré*s,
 chargés des Travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, 🌿 I.

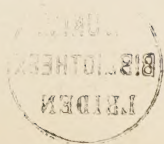


A LA MÉMOIRE DE MON MAÎTRE ET AMI

MONSIEUR LE PROFESSEUR CH. J. PITARD

(1873-1927)

*Professeur à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Tours.
Correspondant du Muséum.*



A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR L. LUTZ

*Professeur de Cryptogamie-Microbiologie à la Faculté
de Pharmacie.*

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MON MAÎTRE

M. LE PROFESSEUR D. BACH

*Chargé de Cours de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie.
Pharmacien-Chef des Hôpitaux.*

*A qui je dois l'inspiration de cette thèse et
qui m'a guidé dans ce travail.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'hommage de
mon respectueux dévouement et de ma vive
gratitude.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. LEMELAND

Ex-Professeur de Clinique à la Faculté.

Accoucheur en Chef des Hôpitaux de Paris.

En témoignage de respectueux attachement.

A MES PARENTS

Dont l'affection et la sollicitude m'ont permis l'achèvement de mes études.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon affectueuse gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553002_0002

INTRODUCTION

La Réaction de GRAM a été imaginée en 1884 par le Docteur GRAM qui étudiait à Berlin, sous la direction de FRIEDLANDER, de nouvelles techniques de colorations de Bactéries sur des coupes d'organes.

Il est intéressant de montrer quel rôle joua le hasard dans cette découverte. GRAM, en effet, colorant des coupes d'organes par le violet de gentiane se trompe de flacon au moment de différencier sa préparation. Au lieu du décolorant habituel, il verse de la solution iodo-iodurée, réactif d'usage courant chez les Botanistes. La préparation se recouvre aussitôt d'un abondant précipité noir. Néanmoins GRAM fait agir son agent de différenciation, l'alcool. Le précipité noir se dissout rapidement, colorant le réactif en violet. La préparation semblait décolorée, mais, examinée au microscope, elle montrait des bactéries colorées en violet noir, tandis que les éléments cellulaires étaient incolores.

GRAM pensait donc tenir la solution du problème qui l'intéressait : colorer électivement des bactéries dans des coupes d'organes.

Plus tard, il s'aperçut que sa méthode n'était pas applicable à tous les germes. Dans ces conditions, en effet, certaines espèces se décoloraient régulièrement.

La méthode de GRAM était donc, en réalité, non pas une nouvelle technique de coloration des bactéries, mais une coloration élective de certaines espèces seulement. Elle permettait de diviser les bactéries en deux grands groupes : les Bactéries qui prennent le Gram ou Bactéries gram-positives et les Bactéries qui ne prennent pas le Gram ou Bactéries gram-négatives.

Cette méthode constitue une des rares méthodes diffé-

rentielles de coloration des Bactéries. D'exécution relativement facile, mettant en œuvre des réactifs courants, elle a eu un très gros succès et son emploi est devenu universel.

Cependant, telle que l'avait conçue GRAM, elle était délicate à pratiquer. Les divers stades de la réaction, et surtout la différenciation, dépendent largement du coefficient personnel qu'on ne peut éliminer. Une grosse difficulté réside, de plus, dans ce fait que les Bactéries gram-positives sont plus ou moins résistantes à la différenciation. Entre des espèces nettement gram-positives et des espèces gram-négatives, on trouve des bactéries très faiblement gram-positives qui seront, par conséquent, très rapidement décolorées. On les trouve cependant gram-positives en diminuant le temps d'action du réactif de différenciation ou en employant un réactif moins brutal.

La méthode de GRAM a fourni l'occasion de travaux nombreux qui ont eu pour but, soit de diminuer les causes d'erreur en atténuant l'influence du facteur personnel de l'opérateur, soit surtout d'élucider le mécanisme profond de la Réaction de GRAM.

Nous avons estimé qu'il y avait intérêt à faire le point d'une question très controversée et parfois assez obscure. C'est pourquoi la première partie de ce travail est consacrée à l'étude des modifications successives qu'on a apportées à la technique primitive de GRAM et à l'exposé critique des théories émises pour expliquer la Réaction. La lecture de ces travaux nous a incité à essayer d'élucider certains points restés obscurs ou négligés. Les résultats que nous avons obtenus font l'objet de la seconde partie de ce travail.

Dans une discussion générale, nous avons pu confronter ensuite nos résultats avec ceux précédemment acquis et en dégager les tendances qui doivent présider à tout essai d'explication de la Réaction de GRAM.

Avant d'aborder l'exposé de ces différentes recherches, nous tenons à exprimer à Monsieur le Doyen RADAIS, qui a bien voulu nous accepter à son Laboratoire en 1930, l'expression de notre profonde gratitude.

Nous sommes heureux de pouvoir exprimer à Monsieur le Professeur LUTZ nos sentiments de respectueuse reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il nous continua dans son Laboratoire et pour le grand honneur qu'il nous fait de présider le jury de cette thèse. Nous le remercions également de la preuve de confiance qu'il nous montra en nous nommant, en octobre 1931, Moniteur des Travaux pratiques de Microbiologie.

Monsieur le Professeur Agrégé BACH, Chargé du Cours de Microbiologie, a bien voulu nous indiquer le sujet de cette thèse et nous guider constamment au cours de notre travail. Il s'est mis entièrement à notre disposition pour nous faciliter la tâche ardue que constituaient des recherches bibliographiques extrêmement nombreuses. Nous avons mis à contribution, à chaque instant, l'énorme travail de traduction et de coordination qu'il s'est imposé, notamment pour les publications allemandes, la connaissance de cette langue nous faisant défaut. Nous ne saurions oublier la preuve de confiance qu'il voulut bien nous témoigner en nous confiant ce sujet de thèse, ni les conseils nombreux et précieux, ni les encouragements qu'il voulut bien constamment nous prodiguer. Nous sommes très heureux de l'assurer aujourd'hui de notre très vive reconnaissance et de notre respectueux attachement.

Nous adressons à Monsieur le Professeur Agrégé MASCRÉ, qui a bien voulu nous faire l'honneur de faire partie du jury de cette thèse, nos sentiments de vive gratitude.

Que Monsieur CHARTIER, Assistant du Cours de Cryptogamic-Microbiologie, veuille bien trouver ici l'expression de nos sentiments très reconnaissants pour l'amical intérêt dont il nous a toujours entouré et la sincère amitié qu'il n'a cessé de nous témoigner.

PLAN

PREMIERE PARTIE HISTORIQUE DE LA REACTION DE GRAM

CHAPITRE I : Modifications à la technique primitive de GRAM.

CHAPITRE II : Limites de la spécificité de la Réaction de GRAM.

Notion du « Gram-Daüer » de NEIDE.

CHAPITRE III : Variations de résistance à la décoloration des organismes gram-positifs.

CHAPITRE IV : Théories de la Réaction de GRAM.

CHAPITRE V : Siège de la Réaction de GRAM.

DEUXIEME PARTIE EXPOSE DES RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I : Substitution, selon NEIDE, d'une étude quantitative à l'étude qualitative de la Réaction de GRAM.

CHAPITRE II : Etablissement d'une technique d'expérimentation appropriée.

CHAPITRE III : Etude de la progression de la décoloration de cellules de levure colorées par la Méthode de GRAM.

CHAPITRE IV : Influence de la fixation sur la résistance à la décoloration d'organismes colorés par la Méthode de GRAM.

CHAPITRE V : Influence de l'âge des cellules sur cette résistance.

CHAPITRE VI : Influence de la nature du milieu de culture sur cette résistance.

CHAPITRE VII : Influence des principaux constituants cellulaires (lipides, nucléoprotides, lipoprotides) sur cette résistance.

CHAPITRE VIII : Conclusion des recherches personnelles.

TROISIEME PARTIE CONCLUSIONS GENERALES

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE DE LA REACTION DE GRAM

CHAPITRE PREMIER.

LES MODIFICATIONS A LA TECHNIQUE PRIMITIVE DE GRAM

GRAM avait imaginé cette technique de coloration dans le but de colorer électivement des bactéries dans des coupes d'organes, mais elle peut s'appliquer de la même façon aux étalements sur lames des bactéries. GRAM fixait à la chaleur en passant la lamelle dans la flamme d'une lampe à alcool. Il colorait en recouvrant la préparation pendant deux à trois minutes de violet de gentiane aniliné d'EHRlich, obtenu extemporanément en ajoutant une solution alcoolique de violet de gentiane à une solution d'eau anilinée (saturée et filtrée) jusqu'à formation d'une pellicule irisée. Il rejetait ensuite l'excès de colorant qu'il déplaçait peu à peu à l'aide d'une solution aqueuse iodo-iodurée de formule :

Iode	1 gr.
Iodure de potassium	2 grs.
Eau distillée	300 grs.

La préparation ayant pris un aspect noirâtre, il laissait

en contact pendant deux à trois minutes et il lavait à l'eau. Examinée à ce moment au microscope, la préparation montrait tous ses éléments colorés en violet noir intense. GRAM continuait la réaction par l'action comme agent de différenciation, d'alcool absolu qu'il laissait agir en plongeant les préparations dans ce réactif jusqu'à leur complète décoloration macroscopique. Un lavage immédiat à l'eau arrêta la différenciation. En examinant les préparations à ce stade, un certain nombre de bactéries seulement était resté coloré en violet noir.

Les autres éléments de la préparation (autres bactéries, éléments histologiques) étaient complètement décolorés.

Nous allons étudier les divers stades de la réaction avec les principales modifications qu'on y a apportées.

1) **Etalement. — Fixation.**

On doit pratiquer des étalements minces qu'on fixe, après desiccation, soit par la chaleur, soit par un mélange complexe constitué essentiellement par des réactifs oxydants acides ou réducteurs.

Nous avons donné à cette importante question de la fixation tout le développement qu'elle mérite au début de notre étude sur l'influence de la fixation sur la résistance à la décoloration de cellules de levure. (p. 78).

2) **Le colorant.**

a) Nature chimique du colorant :

On utilise généralement les dérivés basiques du groupe de la pararosaniline. Il n'y aurait aucune différence, assure EISENBERG (1910) (3)¹ entre les dérivés de la rosaniline et de la pararosaniline. Les ouvrages classiques attribuent faussement à UNNA

(1) Les chiffres entre parenthèses renvoient à l'Index bibliographique.

cette assertion alors que cet auteur indiqua simplement en 1887 que pour mettre en évidence la structure granulaire du *Bacille de la lèpre* au moyen de la réaction de GRAM, il fallait utiliser les dérivés de la pararosaniline. En réalité, on peut utiliser les dérivés les plus divers, mais basiques, de la rosaniline. Cependant les violets donnent les meilleurs résultats.

Les dérivés acides de la rosaniline et de la pararosaniline ne conviennent pas.

Parmi les colorants basiques utilisés on peut citer :

le *violet de gentiane* qu'utilisèrent GRAM, WEIGERT, etc.

le *bleu Victoria B* (dérivé naphтол-méthylé de la pararosaniline) qu'utilisa UNNA en 1888 (2), EISENBERG en 1909 (1);

le *violet de méthyle BB* utilisé par NEIDE en 1904;

le *violet de méthyle B* essayé par EISENBERG en 1909 (1);
etc.

Tous ces produits sont des mélanges complexes de dérivés de la pararosaniline.

Le violet de gentiane, communément utilisé, est un mélange de chlorhydrates d'hexaméthyl- et de pentaméthylrosaniline, avec quelques homologues. Une certaine quantité de dextrine est également ajoutée, parfois dans la proportion de 50 %.

En pratique, les violets de gentiane fournis par l'Industrie diffèrent entre eux et, pour une même maison, diffèrent avec chaque fabrication. Comme il est très difficile, par conséquent, de retrouver des produits identiques, il est recommandé, au début d'un travail, de se procurer dans une même marque le colorant en quantité suffisante pour toutes les recherches.

b) *Mise en solution du colorant :*

Plusieurs conditions doivent être satisfaites pour obtenir une solution colorante de haut pouvoir tinctorial :

— Une solution alcoolique n'a aucun pouvoir tinctorial, car le colorant a plus d'affinité pour l'alcool que pour les tissus. La solution sera donc aqueuse, ou alcoolique très diluée. Dans ces conditions, le colorant ayant plus d'affinité pour les tissus

que pour son solvant, il y aura déplacement du colorant et coloration.

Certains auteurs augmentent le pouvoir tinctorial de la solution aqueuse de violet de gentiane par l'action concomitante d'un mordant. GRAM utilisait, comme nous l'avons vu page 13 l'eau d'aniline saturée obtenue en agitant pendant quelques minutes 5 cc. d'huile d'aniline avec 100 cc. d'eau et en filtrant. L'eau d'aniline était ajoutée, sur la lame, à la solution de violet de gentiane car l'aptitude colorante du mélange n'excédait pas quelques heures.

NICOLLE (M.) propose en 1895 l'acide phénique. Il obtint ainsi un colorant de bonne conservation et de bon pouvoir tinctorial. Sa formule est communément utilisée aujourd'hui :

Sol. sat. de violet dans l'alcool à 95° 10 cc.

Eau phéniquée à 1 % 100 cc.

Cependant les solutions colorantes additionnées de mordant flocculent plus ou moins rapidement et sont par conséquent de conservation assez limitée. C'est pourquoi on a cherché à utiliser des solutions aqueuses, sans mordant.

Dès 1912, JENSEN montre que le mordant est inutile et utilise des solutions aqueuses de violet de gentiane.

En 1922, BURKE reprend cette méthode et, utilisant des colorants médiocres, obtient cependant de bons résultats en ajoutant au colorant, sur la préparation, quelques gouttes de bicarbonate de sodium en solution à 1 %.

La solution aqueuse de violet de gentiane est en réalité une suspension colloïdale. L'addition d'un alcalin, (huile d'aniline de GRAM, bicarbonate de sodium de BURKE) libère la base du colorant qui est seule douée du pouvoir colorant. Cette addition « mûrit » le colloïde qui tend vers la floculation. On y aboutit en continuant l'addition de l'alcalin ou en prolongeant son action. Lorsque la floculation est totale, le pouvoir colorant s'annule.

La concentration en ions H et OH des solutions colorantes joue donc un grand rôle dans la coloration. Les colorants basiques, en général sels d'un acide fort (H Cl) et d'une base faible sont fortement hydrolysés en solution aqueuse ($\text{pH} = 5$

environ) et leur pouvoir colorant est médiocre. L'addition d'un corps comme l'huile d'aniline ramène le pH aux environs de 7 et libère la base qui, étant insoluble, a tendance à précipiter. Le début de la floculation est l'instant le plus favorable pour la coloration.

On a cherché à prolonger le plus possible cet état colloïdal de la solution puisque le pouvoir colorant est alors maximum. On peut y arriver par l'addition de glycérine, de divers électrolytes, de colloïdes protecteurs, etc.

STEARN E. W. et STEARN A. E. (1) vérifient la conception précédente de la coloration en montrant l'influence du point iso-électrique des constituants cellulaires sur leur aptitude à subir une coloration. Leur affinité pour les colorants basiques, en effet, ne se manifeste que si l'on se trouve du côté alcalin de leur point iso-électrique et est d'autant plus accentuée que la réaction alcaline est plus forte. Seule la précipitation de la base empêche l'emploi de solutions trop alcalines.

Du côté acide du point iso-électrique, seuls les colorants acides sont aptes à colorer les tissus.

Le « *Schwebefällung* » de UNNA (trouble naissant) étudié en tenant compte de ces travaux indique qu'on assiste au début de précipitation de la base, la réaction du milieu étant optima pour une bonne coloration.

ATKINS, en 1920, proposa à l'**Association des Bactériologistes américains**, en tenant compte des faits précédents, la technique de coloration suivante :

On colore à l'aide d'une solution acide (grâce à du sulfate d'aniline) de violet de gentiane, très stable et sans grand pouvoir colorant, de formule suivante :

Sol. sat. de violet de gentiane dans l'alcool à 95° .. 1 p.

Sol. de sulfate d'aniline à 1 % 3 p.

On ajoute ensuite une solution iodée alcaline :

Iode 2 grs.

Soude normale 10 cc.

Eau distillée 90 cc.

Ce réactif abaisse la concentration en ions H et précipite la base.

Nous avons vu que BURKE (1922), ainsi d'ailleurs que KOPELOFF et BEERMAN (1922), SHEPPE et CONSTABLE (1923) et une grande partie de l'Ecole américaine, ajoutent, lors de la coloration, un alcali (bicarbonate de sodium) à la solution aqueuse de violet de gentiane. Citons par exemple la technique adoptée par KOPELOFF et BEERMAN, qui est une combinaison des méthodes de ATKINS et de BURKE et que les auteurs déclarent excellente :

- a) Séchage et fixation.
 - b) Colorer 5 minutes avec le réactif suivant :

Sol. de violet de méthyle 6 B à 1 %		30 gouttes.
Sol. de bicarbonate de sodium à 5 %		8 —
 - c) Laver avec la solution iodo-iodurée et laisser agir un excès de cette solution pendant 2 minutes.
- Solution iodo-iodurée :
- | | |
|---------------------------|--------|
| Iode | 1 gr. |
| Iodure de potassium | 2 grs. |
| Soude normale | 10 cc. |
| Eau distillée | 90 cc. |
- d) Enlever l'excès de solution sans laver à l'eau ni sécher.
 - e) Traiter par de l'acétone à 100 % jusqu'à décoloration complète (10 secondes en général).
 - f) Sécher à l'air.
 - g) Contre-colorer par la fuchsine basique à 0,10 %.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS COLORANTES.

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

A) Solutions additionnées de mordant :

- 1) On dissout le colorant dans le moins possible d'alcool fort et on ajoute ensuite un grand volume d'eau additionnée de mordant. Si l'on ajoute l'eau à la solution alcoolique ou si l'on opère inversement, selon la rapidité de l'opération aussi, le pouvoir tinctorial varie. (GRAM, UNNA, NICOLLE M., KUHNE, etc...).
- 2) On dissout le colorant et le mordant (phénol par exemple) dans l'alcool fort et on ajoute peu à peu l'eau distillée. (PHILIBERT, LANGERON, EISENBERG, etc...).

B) Solutions sans mordant :

JENSEN (1912) emploie une solution aqueuse simple à 1 %, sans mordant, de violet de gentiane. On agite le colorant avec l'eau, laisse quelques heures en contact et on filtre. Cette solution demeure très longtemps stable.

BURKE, en 1922, utilise la même technique.

Quelle que soit la formule utilisée, on opère, pour la coloration, soit en recouvrant la préparation du colorant, soit en plongeant la préparation dans un tube BORREL contenant le colorant.

L'état de la solution, sa concentration, sa température, le temps d'action influent sur la résistance ultérieure du matériel à la décoloration.

3) La solution iodo-iodurée.

On emploie maintenant la solution iodo-iodurée de GRAM à une plus haute concentration, depuis NICOLLE M. (1895) : 1-2-200. BURKE (1922) renforce encore le titre de la solution : 1-2-100. Il faut une solution aqueuse, l'iodure de potassium n'étant qu'un solvant de l'iode.

On ne doit utiliser que des solutions récentes car elles s'acidifient assez vite et deviennent alors impropres à la coloration. L'iode fut utilisé sous diverses formes :

UNNA (1888) (2) utilisa l'iode naissant produit par l'action d'eau oxygénée sur l'iodure de potassium et obtint de belles colorations.

LASSEUR et SCHMITT (1927) utilisant des vapeurs d'iode n'obtinrent pas de bons résultats.

NICOLLE CH. (1903), remplaça l'iode par le brome et obtint de bons résultats. Il utilisait, à la place de la solution iodo-iodurée la solution bromo-bromurée de formule analogue :

Brome	1 gr.
Bromure de potassium	3 grs.
Eau distillée	100 cc.

La conception de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER (1910), attribuant à l'iode une action oxydante sur les acides gras non saturés se comprend de la même façon par substitution du brome à l'iode et permet d'expliquer les résultats de NICOLLE.

Divers produits ont été substitués à l'iode, mais il semble bien qu'il ne s'agisse plus de la méthode de GRAM :

C'est ainsi que CLAUDIUS, en 1897, remplace l'iode par l'acide picrique et emploie le chloroforme comme décolorant. Il obtint des résultats analogues à ceux obtenus avec la Réaction de GRAM classique.

VIERLING, en 1922, utilise le picrate d'ammoniaque, STEARN et STEARN en 1924, l'eau oxygénée.

On a également utilisé, avec des succès variables, le permanganate de potassium, le bichromate de potassium, le chlorate de potassium, le nitronaphtol, etc...

D'autre part, BÉGUET, en 1929 (2), supprime l'iode et obtient une coloration aussi élective.

Expliquer le rôle de l'iode c'est en somme expliquer la réaction elle-même. Nous verrons, lors de l'exposé des principales théories de la Réaction de Gram, les arguments apportés par les différents Auteurs.

On peut cependant les résumer très brièvement ainsi :

A) *L'iode agit sur le colorant seulement mais la perméabilité de la cellule règle l'entrée de l'iode et la sortie du complexe « colorant + iode ».*

1) Pour BRUDNY, (1908), les Bactéries gram-négatives sont peu perméables à l'iode tandis que les Bactéries gram-positives, beaucoup plus perméables à l'iode, permettent sa combinaison avec le colorant.

2) Pour BÉNIANS, (1912-20), les Bactéries gram-négatives d'un premier groupe sont très perméables à l'iode, ainsi qu'au colorant et qu'au complexe « colorant + iode ». Les Bactéries gram-négatives d'un second groupe, imperméables au colorant et à l'iode ne permettent même pas la formation du complexe à l'intérieur de la cellule.

3) Pour BURKE et BARNES, (1922-29), l'iode contracte avec

le colorant un complexe que la faible perméabilité des cellules gram-positives empêche de sortir.

4) Pour KAPLAN et KAPLAN, (1933), les Bactéries gram-positives sont peu perméables au colorant et à l'iode en solution alcoolique tandis que les Bactéries gram-négatives, très perméables, laissent sortir les éléments du complexe « colorant + iode ».

B) *L'iode agit sur des constituants cellulaires.*

1) *Fixation de l'iode sur les liaisons éthyléniques des acides gras non saturés*, aboutissant à la formation d'un corps contractant avec le colorant une combinaison très solide et résistante à la dissociation par l'alcool. (GUERBET, MAYER et SCHAEFFER, 1910).

2) *Oxydation par l'iode des protides cellulaires* d'où déplacement de leur point isoélectrique et affinité accrue pour les colorants basiques (STEARN et STEARN, 1923-30).

4) Les agents de différenciation.

GRAM employait, dans ses premières recherches (1884), l'alcool absolu. Il utilisa par la suite, mais sans résultats très intéressants, un décolorant acide : alcool chlorhydrique ou azotique à 3 %.

En 1887, WEIGERT utilisa l'aniline mais les préparations se conservaient mal, à moins d'un lavage au xylol très prolongé. Ce réactif n'est plus utilisé actuellement.

En 1904, KISKALT étudiant les divers homologues de l'alcool méthylique conclut que leur activité décroît avec le rang de l'alcool, l'alcool méthylique étant très actif et l'alcool amylique sans action. L'addition d'eau à l'alcool absolu, d'autre part, modifie considérablement sa valeur décolorante : le précipité iode + colorant est d'autant plus soluble dans l'alcool que celui-ci est à un titre plus élevé mais, inversement, l'addition d'eau augmentant la perméabilité de la membrane des bactéries gram-positives, le précipité qui est formé à l'intérieur de la cellule est entraîné beaucoup plus vite si le décolorant est aqueux (BURKE, 1922).

On a observé d'ailleurs que l'addition d'eau à l'alcool augmente la vitesse de décoloration tant que le titre final dépasse 70° (NEIDE, 1903-1904). Avec de l'alcool à 70°, la vitesse de décoloration des bactéries gram-positives et gram-négatives est voisine. En diminuant encore le titre de l'alcool, on observe le phénomène inverse : la vitesse de décoloration diminue de plus en plus et la différenciation devient impossible. BURKE rapporte qu'avec l'alcool à 50°, les bactéries gram-négatives ne se décolorent pas après plusieurs heures d'action.

Un fait important se dégage de ces constatations, sur lequel les ouvrages classiques n'insistent pas assez : *la nécessité d'essorer les préparations avant de faire agir le réactif de différenciation*. Si l'on se contente en effet de laisser s'égoutter plus ou moins grossièrement l'eau qui a servi à entraîner la solution iodo-iodurée, les premières gouttes du différenciateur vont être diluées par l'eau restée sur la lame. Le titre résultant de l'alcool, à ce stade de l'opération est inconnu et son activité incertaine. Celle-ci sera très énergique, brutale si l'alcool est peu dilué et presque nulle si l'alcool est très dilué. De toute façon l'addition de nouvelles quantités du différenciateur élimine ce réactif dilué et la décoloration devient plus régulière. Il n'en existe pas moins une cause d'erreur car des germes fragiles peuvent s'être décolorés très rapidement au moment où agit un réactif trop énergique, très brutal peut-être. C'est pourquoi BURKE insiste sur l'essorage des préparations. C'est pour lui le temps le plus délicat de la réaction. Il ajoute d'ailleurs que l'on doit essorer à l'aide de papier-filtre sans dessécher complètement car, dans ce cas, la dissolution du colorant précipité peut être assez retardée pour qu'avant d'être intégralement réalisée sur les particules libres et les Bactéries gram-négatives, les Bactéries gram-positives soient décolorées. Ceci est dû à la modification de la perméabilité de la membrane.

Nous avons utilisé cette technique au cours de nos recherches.

L'acétone, employée pure ou mélangée à l'alcool est le réactif le plus employé actuellement. Utilisée par NICOLLE M. dès 1895, elle aurait l'avantage de décolorer plus rapidement, d'accentuer la différence entre les deux groupes. Naturellement la brutalité de son action rend son maniement délicat.

Dans certaines recherches spéciales, on a utilisé des différenciateurs acides, par exemple de l'alcool additionné de 2 à 3 % d'acide chlorhydrique, azotique, sulfurique, lactique (GRAM, GÜNTHER) ou même des dilutions aqueuses d'acides, acide acétique à 5 %, acide chlorhydrique à 10 % (SCHMITT (1920), LASSEUR et SCHMITT (1927)).

En 1929, COUDRAY remplaça l'alcool par des solutions de sels neutres et ses résultats peuvent s'expliquer par la seule action des sels à réaction acide qui entrent dans la composition de ses réactifs.

Récemment, BÉGUET (1929) (2), a fait une constatation très importante : d'après cet auteur, en effet, on peut remplacer l'alcool par tout liquide miscible à l'eau et doué d'une faible tension superficielle : solution de savon à 1 %, solution de pé-largonate de sodium, etc...

Enfin, quel que soit le réactif employé et indépendamment du temps d'action dont on verra plus loin toute l'importance puisqu'aucun germe, même très fortement gram-positif, ne peut résister indéfiniment à son action décolorante, il faut tenir compte de la température du bain et agiter fréquemment pour régulariser son action.

5) La contre-coloration.

Pour apprécier la perte du caractère gram-positif d'une cellule, il est deux moyens :

a) Faire agir un contre-colorant donnant une teinte différente de la coloration violet noir des germes gram-positifs et qui fera voir, par contraste, les éléments gram-négatifs. C'est le procédé communément employé pour le diagnostic clinique.

On utilise, comme colorants basiques :

— la fuchsine phéniquée très diluée.

— la safranine [R. et W. ALBERT (1901), SNYDER (1912), BURKE (1922)].

— le rouge neutre en milieu acétique [LUTZ (1919)].

— la vésuvine ou brun Bismarck.

comme colorant acide :

— l'éosine diluée (NICOLLE M., 1895).

b) Observer la décoloration et compter comme gram-négatives les cellules complètement décolorées ou mieux presque complètement décolorées car la décoloration complète, longue à obtenir, rend les numérations très fatigantes pour l'œil.

Cette méthode, difficilement utilisable, et d'ailleurs inutile en clinique, devient indispensable quand il s'agit de recherches théoriques. L'emploi d'un contre-colorant amène en effet de grosses causes d'erreur :

WEIGERT puis HOGGE (1893) montrèrent qu'un colorant peut déplacer un autre colorant. LASSEUR a proposé une vérification simple de ce fait dans son travail sur la réaction de GRAM (1927) en montrant que des bactéries gram-positives deviennent gram-négatives si l'on fait agir un certain temps le colorant de contraste. Le complexe de GRAM est déplacé par la fuchsine même diluée. D'autre part la décoloration qui est progressive ne peut être saisie dans tous ses détails par une contre-coloration puisque celle-ci est brutale.

C'est pourquoi il nous a semblé préférable de ne pas employer, dans nos recherches, de contre-colorant. Tous nos examens ont porté sur l'appréciation de la décoloration plus ou moins poussée, c'est-à-dire sur la comparaison entre elles de teintes souvent très peu différentes.

NEIDE, étudiant en 1903 « la décoloration par l'alcool des bactéries colorées par le Gram en temps que diagnostic d'espèces » et « recherchant les facteurs entrant en jeu dans la coloration par le Gram » conclut qu'on ne peut choisir pour test la décoloration totale et propose un certain ton mauve pâle qu'il donne dans une planche, en face de la page 521 de son travail.

LASSEUR (1927) arrive aux mêmes conclusions et propose comme test une teinte plus pâle que celle de NEIDE et qui nous a paru plus rationnelle : la teinte gris violacé un peu inférieure à la teinte 503 A du Code des Couleurs de KLINCKSIECK et VALETTE.

Nous avons adopté, pour nos expériences, le test de LASSEUR.

CHAPITRE II

LES LIMITES

DE LA SPECIFICITE DE LA REACTION DE GRAM.

LE « GRAM-DAUER » DE NEIDE

Nous avons déjà signalé qu'entre les bactéries fortement gram-positives et les bactéries franchement gram-négatives existaient des espèces intermédiaires. Le *B. Diphtérique* est universellement connu comme une bactérie faiblement gram-positive et un procédé de diagnostic est même fondé sur cette propriété. Le *B. Dysentérique*, le *Gonocoque* (HJMANNS VAN DEN BERG (1896), peuvent paraître gram-positifs si on ne pousse pas la décoloration.

Entre les bactéries gram-positives et les bactéries gram-négatives, il n'existe pas en effet de différence fondamentale. NEIDE (1903) a montré que toutes les bactéries gram-positives pouvaient être décolorées en prolongeant l'action du réactif de différenciation. Il a appelé « *Gram-Daüer* » le temps nécessaire à décolorer une bactérie, ou plutôt à l'amener, ainsi que nous l'avons signalé page 24, à un certain ton violet pâle qu'il a donné dans une planche de son mémoire. En se plaçant dans des conditions expérimentales bien définies (âge de la cellule, milieu de culture, technique de décoloration), il a pu montrer que le « *Gram-Daüer* » était constant pour une espèce donnée. LASSEUR et SCHMITT (1927) ont confirmé et étendu les résultats de NEIDE en estimant toutefois qu'il valait mieux parler de « *vitesse de décoloration* » plutôt que de « *durée de décoloration* ».

CHAPITRE III

PERTE DE LA PROPRIÉTÉ DE PRENDRE LE GRAM

Une décoloration prolongée ne permet donc à aucune cellule, ainsi que nous venons de le voir, de rester gram-positive.

En outre, l'aptitude normale à prendre le Gram peut disparaître sous des influences variées dont les principales sont les suivantes :

1) Le vieillissement des cultures.

Dès 1890, ZIMMERMANN observe que le *B. Pyocyaneus* et d'autres bactéries fluorescentes qui ne liquéfient pas la gélatine prennent le Gram quand on choisit des colonies jeunes et qu'on ne prolonge pas la décoloration. En 1896, CZAPLEWSKI montre que les irrégularités observées dans la décoloration des bactéries, notamment chez le *B. Diphtérique*, tiennent à l'emploi de vieilles cultures. Seul le *B. Diphtérique* jeune prendrait bien le Gram. Suivant les espèces, il y aurait tous les intermédiaires entre les formes gram-positives et gram-négatives. En 1898, GÜNTHER émet une idée différente. Selon lui, les bactéries prennent ou ne prennent pas le Gram. Il n'y aurait pas d'intermédiaire. Les résultats douteux publiés par certains auteurs seraient dûs, dit-il, à des fautes de technique : décoloration par l'alcool trop prolongé, par exemple...

En 1902, GRIMME confirme CZAPLEWSKI et écrit que les jeunes cultures prennent mieux le Gram que les cultures âgées. En 1903, NEIDE confirme l'opinion de CZAPLEWSKI et de GRIMME et infirme celle de GÜNTHER. Selon lui les divers stades de déve-

loppement présenteraient une résistance variable à la décoloration et les formes jeunes restent plus longtemps colorées. Il remarque que la résistance des spores et des ébauches de spores dans les sporanges est très grande, ainsi que celle des bâtonnets germinatifs. En 1908, BRUDNY confirme que la réaction varie avec l'âge de la culture. Il cite le travail de ZIMMERMANN et écrit qu'il est bien connu que les vieilles cultures se colorent mal. En ce qui concerne les résultats variables fournis par les divers individus d'une espèce, GRIMME, MEYER et GOTTHEIL ont vu que les bâtonnets âgés de *Bacterium Cohaerens*, dégénérés, présentent des granulations gram-positives dans un ensemble devenu gram-négatif. BRUDNY cite également BRAEM qui observa les mêmes aspects avec le *B. du Charbon* et CAHN avec le *B. Bifidus*.

En 1927, LASSEUR et SCHMITT sont amenés à leur tour à rechercher l'influence de l'âge de la culture et arrivent aux résultats suivants :

1) Le *Bacillus Mesentericus Fuscus* âgé de 24 heures est décoloré en 70 minutes tandis que la décoloration demande 80 minutes pour la même bactérie âgée de 48 heures.

2) Résultat analogue avec le *Bacillus Mesentericus Niger*. Sur la foi de cette expérience, portant sur des cellules d'âge relativement proche (culture de 24 heures dans le premier cas et de 48 heures dans le second), les auteurs concluent, page 559 de leur mémoire : « Il y a pour chaque espèce bactérienne un stade où la vitesse de décoloration atteint son maximum. C'est en général au moment où le cytoplasme n'offre aucune différenciation et paraît homogène, ainsi que cela s'observe avec les plastides jeunes. Mais comme chaque espèce parcourt son cycle avec une vitesse déterminée (pour des conditions données) il en résulte que le stade de durée maximum correspond à des cultures dont l'âge varie avec l'espèce expérimentée. » LASSEUR et SCHMITT semblent donc infirmer les résultats généralement admis. Nous devons ajouter qu'ils diminuent sérieusement la valeur de leur conclusion lorsqu'ils présentent, page 560 du même travail, à propos de l'influence de la nature du milieu de culture, la relation d'une expérience portant sur des cultures de *Staphy-*

lococcus Aureus de 24 et 48 heures provenant de divers milieux. Ils trouvent en effet des vitesses de décoloration généralement identiques pour les souches de 24 et 48 heures provenant du même milieu. Ils présentent même un résultat où la souche de 48 heures s'est décolorée un peu plus vite que la souche de 24 heures, ce qui les amène à écrire : « Dans cet essai, les cultures de 24 et 48 heures offrent des vitesses de décoloration du même ordre. Pour obtenir des variations notables de vitesse, il faudrait opérer sur des cultures plus âgées ». Notons que c'est cependant en s'appuyant sur les résultats fournis par des cultures de 24 et 48 heures qu'ils ont présenté leur conclusion relative à l'âge de la cellule.

Récemment, SOLARINO (1930), au cours de « recherches sur la gram-résistance des germes », montre que le *B. Mesentericus* et le *B. Subtilis* modifient pendant leur développement leur comportement vis-à-vis de la Réaction de GRAM, sur milieux naturels ou artificiels. En pratiquant des ensemencements en milieu liquide ou solide de $\text{pH}=7$, il s'aperçut en outre que ces milieux arrivent à $\text{pH}=8$ ou 9 et que, parallèlement, les germes deviennent gram-négatifs en même temps qu'apparaissent des formes d'involution.

Dans le but de préciser des résultats parfois divergents nous avons cherché à étudier les variations de la résistance à la décoloration avec l'âge de la cellule en nous attachant au préalable à mettre au point une méthode de coloration et de décoloration susceptible de rendre la décoloration suffisamment lente pour qu'on puisse en saisir facilement les états intermédiaires et l'état final. De plus, le phénomène s'exprime alors quantitativement. Nous expliquons dans la seconde partie de ce travail la technique suivie et les résultats obtenus.

2) L'autolyse des suspensions microbiennes conservées aseptiquement.

Dès 1888, BRAEM met en suspension dans de l'eau distillée du *Bacille du Charbon*, du *Vibrion Cholérique* et du *Staphylocoque* après avoir soigneusement débarrassé ces bactéries de

leur milieu de culture. Il voit apparaître des modifications de forme, de colorabilité, de taille. La mort survient après un temps variable, 12 jours pour le *B. du Charbon*, 60 jours pour le *Vibrion Cholérique*. Le caractère le plus précoce, ajoute BRAEM, est la perte du Gram. En 1901, ALBERT (R. et W.) montrent que la levure tuée perd son Gram par simple autolyse dans l'eau additionnée de toluol ou de chloroforme ou par séjour dans l'eau sucrée. Au cours de ce processus, ajoutent-ils, presque tout le contenu cellulaire se dissout. COMBERG étudiant une souche de *Vibrion Septique* et une souche de *Bacille de la Gangrène gazeuse* sur milieux solides, avec ou sans sucres, observe la perte du Gram sur la souche de 14 jours. Sur milieu liquide les bactéries gardent le Gram. Il admet que la perte du Gram est due à des ferments autolytiques déversés dans le milieu solide. Dans les milieux liquides, le ferment serait trop dilué pour pouvoir exercer son action.

En 1902, TROMMSDORFF note que des phénomènes d'autolyse peuvent amener la perte du Gram, dans le cas de cellules de levure.

En 1911, BÜRGERS conclut de ses recherches que sauf pour les espèces suivantes : *Staphylocoque*, *Streptocoque*, *Bacterium Megatherium*, *Levures*, les autres Bactéries, par auto-digestion à 37°, en présence de chloroforme, perdent rapidement leur colorabilité et deviennent granuleuses.

C'est de ces mêmes phénomènes d'autolyse qu'il faut rapprocher les observations de CHURCHMAN (1929) sur la perte du « Cortex » gram-positif de certains cocci, par autolyse à 52° ou du *Bacille du Charbon* en présence de certains colorants.

3) Culture en présence de substances dysgénésiques.

SIMONINI (1914) relate que, par action du nitrate d'ammonium et de thorium ou de cérium, les *Bacterium Coli*, *Typhi*, *Dysenteri*, etc... peuvent avoir un Gram modifié. Le *Bacillus Subtilis*, le *Bacille diphtérique* poussant sur gélose au Lanthane-cérium deviendraient gram-négatifs.

CHARRIN observa des faits analogues avec l'argent colloïdal qui fait perdre son gram au *Pneumocoque*.

EISENBERG (1909) obtient les mêmes résultats douteux avec l'électrargol.

+) Abaissement de la tension superficielle des milieux de culture par le sulforicinate ou le pélargonate de sodium.

BÉGUET (1929) (1) montra que la perte du Gram débute quand la tension superficielle du bouillon de culture atteint 40 dynes. Elle est totale dans un bouillon de 32 dynes. Le bouillon primitif avait une tension superficielle de 46 dynes.

5) Changement d'habitat.

Dès 1892, MILLS indique que le caractère gram-positif ou négatif peut être modifié par les conditions de culture et de milieu. Tel microbe qui prend le Gram dans le pus ne le prend plus sur les milieux de culture.

En 1892 également, SCHMIDT observe que le *Bacterium Coli Commune* et le *Bacillus Lactis Aerogenes* étudié dans un contenu intestinal riche en graisse sont gram-positifs. Par contre, ils deviennent gram-négatifs sur un contenu intestinal pauvre en graisse. Pour vérifier qu'il s'agit bien des mêmes germes, SCHMIDT aurait pu rendre gram-positif du *Bacterium Coli* en le cultivant sur de la gélatine au beurre.

En 1896, WILDE ne peut reproduire cette expérience, mais il remarque qu'une espèce encapsulée, isolée de la souris et pathogène pour cet animal est gram-positive in vivo et devient gram-négative en culture. Il conclut que la réaction de GRAM ne doit être pratiquée que sur des souches pures et ayant poussé sur le milieu habituel car la composition du milieu peut influencer sur leur comportement vis-à-vis de la réaction de Gram.

En 1903-1904, NEIDE aboutit aux mêmes conclusions. Il re-

late l'action sur le *Bacterium Tumescens* d'un milieu gélosé additionné ou non de glucose. En milieu glucosé, les bactéries sont plus résistantes à la décoloration. Il ajoute : « le transport d'une espèce de son milieu naturel sur une gélose sucrée modifie complètement ses conditions de nutrition ».

En 1908, BRUDNY reprend la question et écrit : « La composition du milieu..... peut modifier suffisamment le protoplasme bactérien pour changer sa colorabilité ».

En 1927 enfin, LASSEUR et SCHMITT citent les expériences anciennes de CRAMER (1891-92-95-98), les recherches récentes de LOBSTEIN (1922) montrant la relation étroite entre le milieu de culture et la composition chimique des plastides. Il en résulte, disent-ils, des variations dans la colorabilité de l'élément bactérien. L'importance de ces variations augmente à mesure qu'on s'éloigne des conditions normales d'alimentation. LASSEUR et SCHMITT voulant vérifier l'action de milieux de culture « humanisés » sur le comportement du *Staphylocoque doré* vis-à-vis de la réaction de Gram ensemencent ce germe sur de la gélose-bouillon additionnée de divers mélanges de protides animaux : liquide d'ascite, sang. Ils n'observent aucun changement appréciable dans la décoloration, ce qu'on pouvait prévoir puisque le *Staphylocoque* issu de l'organisme animal (abcès, ostéomyélites, etc...) et examiné avant tout ensemencement est fortement gram-positif.

6) Traitements chimiques.

Ces phénomènes doivent être distingués de la perte du Gram par les cellules tuées soumises à certains traitements chimiques ayant pour but de dissoudre les substances réputées gramophiles :

a) *L'action des ferments protéolytiques* : (pepsine, trypsine, papaïne) a été souvent étudiée [CEDERKREUTZ, 1908; BÜRGERS, 1911, etc...]

b) *L'action des alcalis et surtout des acides* a été étudiée en particulier par DEUSSEN (1918-21). On a attribué la perte

du Gram à l'hydrolyse des nucléoprotides (DEUSSEN), de protides simples, de lipoprotides pour d'autres auteurs.

c) *Action des solvants des lipides.*

DREYER, SCOTT et WALKER (1911), REICHERT (1913) assurent que des Bactéries traitées par les solvants des lipides perdent leur caractère gram-positif. JOBLING et PATERSEN, en 1914, montrent que la résistance des Bactéries à la décoloration est abaissée par l'extraction des lipoides par les solvants. Les travaux plus précis de DEUSSEN (1918-21), de GUTSTEIN (1924-27) et de SCHUMACHER (1923-28) ont montré que l'on ne pouvait attribuer aux seuls lipides entraînables par les solvants neutres le caractère gram-positif d'une cellule.

Nous avons nous-même, au cours de notre travail, essayé de déterminer la part exacte des lipides dans la résistance d'une cellule à la décoloration. Nous avons étudié en détail les procédés qu'ont suivis les différents auteurs pour débarrasser la cellule des substances définies auxquelles ils attribuaient la Réaction de GRAM. D'autre part, les données bibliographiques que nous venons de résumer très brièvement sont exposées avec plus de détails au début de l'exposé des théories chimiques de la Réaction de GRAM (page 41 et suivantes).

Cependant, s'il est possible de transformer une bactérie gram-positive en bactérie gram-négative par certains procédés de culture ou par traitements chimiques appropriés, il n'en est pas moins établi que le caractère gram-positif est très stable pour chaque espèce.

Il est très difficile de rendre une cellule gram-négative, et après cette transformation, il suffit de replacer la cellule dans son milieu initial pour qu'elle reprenne, avec ses caractères primitifs, son caractère gram-positif. La propriété de prendre ou de ne pas prendre le Gram est en réalité intimement liée à la structure physico-chimique de l'espèce. EISENBERG (1919 (9)) a pu faire 70 passages de *Staphylococcus* à températures dysgénésiques (42-48°) sans parvenir à le rendre gram-négatif dans les conditions normales. Il en conclut que la propriété gram-positive d'une espèce est un caractère spécifique très solide que l'on ne peut que très difficilement modifier.

CHAPITRE IV

THEORIES DE LA REACTION DE GRAM

La réaction de GRAM a suscité et suscite encore bien des recherches qui ont pour but d'élucider son mécanisme profond qui reste encore douteux.

— Résulte-t-elle d'une adsorption du colorant par le colloïde cellulaire ? Les partisans de cette théorie physique sont les moins nombreux.

— Résulte-t-elle plutôt d'une combinaison chimique entre le violet de gentiane, l'iode et un ou plusieurs constituants cellulaires ? Les partisans de cette théorie chimique ont recherché quelle substance ou quel groupe de substances était le support de la réaction. Ils ont invoqué essentiellement soit les nucléoprotides, soit les lipides, soit les lipoprotides.

— Les substances gramophiles sont-elles réparties dans toute la cellule, ou se trouvent-elles localisées dans certaines parties du cytoplasme ? (Théorie de l'ectoplasme, théorie du « cortex » de CHURCHMAN...)

Nous allons étudier dans ce chapitre ces différentes hypothèses en les faisant suivre des principales critiques auxquelles elles ont donné lieu.

I. THEORIES PHYSIQUES DE LA REACTION DE GRAM.

A) **Théorie granulaire de FISCHER** (1899) (1).

A. FISCHER, comparant la réaction de GRAM à un simple phénomène de teinture admit que le colorant se fixait à la

surface de granulations protoplasmiques et d'autant plus fortement que la taille des granules était plus grande. Il fondait son opinion sur l'expérience suivante : en précipitant par le bichromate de potassium les albumoses de la peptone de WITTE et en colorant par la méthode de GRAM les fins granules obtenus, seuls les plus gros restaient colorés par la méthode de GRAM.

Divers Auteurs ne purent reproduire cette expérience et, on peut se demander, d'autre part, s'il existe dans la cellule des granules d'albumoses. Une coloration simple, au bleu de méthylène par exemple, ne donnerait-elle pas un résultat analogue ? Dans ce cas, il y aurait simple fixation et non combinaison. Or, la résistance à la décoloration de certains organismes gram-positifs particulièrement résistants montre qu'il ne saurait y avoir qu'un simple phénomène d'adsorption.

B) **Théorie de la perméabilité.**

Cette théorie fut énoncée par FISCHER en 1903 (2), développée par BRUDNY (1908), reprise et modifiée par EISENBERG (1909-19), BENIANS (1912-1919-20), GASSNER (1918), BURKE (1922), BURKE et BARNES (1929) et par KAPLAN et KAPLAN (1933).

1) *Travaux de Fischer :*

FISCHER constata que les bactéries gram-positives sont en général perméables et non plasmolysables tandis que les bactéries gram-négatives sont imperméables et plasmolysables.

2) *Travaux de Brudny :*

BRUDNY tenant compte de ces résultats conçut ainsi la réaction de GRAM : Les colorants pénètrent dans la cellule en occupant les espaces inter-micellaires. L'iode pénètre à son tour et contracte une combinaison avec le colorant, combinaison insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool-acétone en une solution violette. Le précipité obtenu, de volume moléculaire plus grand que celui de la matière colorante, sera très difficile à enlever chez les bactéries gram-positives. Les bactéries

gram-négatives, dont la *paroi* serait imperméable à l'iode ne laisseraient pas se produire cette combinaison. Le dissolvant peut donc enlever facilement le colorant qui, lui, aurait pu pénétrer ou être simplement adsorbé superficiellement.

La réaction de GRAM pour BRUDNY se ramènerait donc en définitive à une question de perméabilité vis-à-vis de l'iode.

A l'appui de cette théorie, on peut remarquer le renforcement de la réaction par l'emploi de solutions iodo-iodurées plus concentrées ou agissant plus longtemps, ou utilisées à chaud.

Parmi les objections qu'on a soulevées, on peut citer les suivantes :

1° Le protoplasme formant un gel colloïdal, on ne conçoit pas l'existence d'espaces intermicellaires.

2° Les cellules qu'on colore sont mortes et l'hémiperméabilité des cellules vivantes disparaît généralement à la mort de la cellule. Les expériences de FISCHER, faites sur des bactéries vivantes, ne sont donc pas applicables ici.

3° KAPLAN (M. L.) et KAPLAN (L.) (1933) montrent que les *Bactéries gram-négatives* sont, au contraire, très perméables à l'iode.

3) Travaux de Bénians :

Rôle de la perméabilité de la membrane, d'après BENIANS :

BRUDNY, dont nous venons d'exposer la théorie, considère la perméabilité ou l'imperméabilité de la cellule prise en bloc. BENIANS a développé cette théorie physique en montrant que seule la membrane devait être envisagée. Dilacérant mécaniquement, au moyen d'abrasifs, des cellules de *Staphylocoque*, il obtient, à côté de cellules intactes, de nombreux débris formés de fragments de membrane libre et de petites masses de cytoplasme. La réaction de GRAM classique étant pratiquée sur ce matériel, seules les cellules intactes prennent le Gram.

Le protoplasme libre et la membrane libre étant décolorés, BENIANS en conclut que la réaction ne repose pas sur une combinaison du colorant et du protoplasme ou du colorant et de la membrane. Il interprète ainsi la réaction : le violet se fixe

d'abord par adsorption sur le protoplasme. L'iode intervenant ensuite dissocie ce complexe en se combinant au violet pour donner un corps de poids moléculaire élevé difficilement dissociable par l'alcool à cause de la faible perméabilité de la membrane. Si la membrane n'existe plus (cas des particules libres de protoplasme, dans son expérience), la dissociation est immédiate.

Les organismes gram-négatifs manqueraient donc de perméabilité vis-à-vis de l'alcool.

Dans l'interprétation de la Réaction chez les organismes gram-négatifs, BENIANS voit deux phénomènes distincts :

a) Chez certaines espèces (type *Gonocoque*), la membrane est très perméable : colorant, iode, complexe « colorant + iode » passent facilement. A l'appui de cette hypothèse, on peut remarquer qu'une différenciation peu poussée laisse ces germes gram-positifs. (HJMANNS VAN DEN BERG (1896), pour le *Gonocoque*).

b) Chez les autres espèces (par exemple *B. Coli*, *Typhi*, *Dysenteri*), le colorant ne pouvant pénétrer dans la cellule reste fixé par adsorption et est facilement entraîné par le traitement ultérieur à l'alcool.

1) Travaux de Burke et de ses collaborateurs (1922-28-29).

BURKE (1922) apporte en faveur de la théorie de BENIANS l'expérience suivante, *le renversement de la Réaction de GRAM* :

On traite diverses cellules par une solution alcoolique du complexe « violet de gentiane + iode », dont on augmente l'affinité colorante par l'addition de carbonate acide de sodium ou de phosphate disodique. Puisque la membrane des organismes gram-positifs, d'après BENIANS, doit s'opposer à la sortie du complexe, elle doit également s'opposer à sa rentrée. C'est en effet ce qu'on observe.

Inversement, les bactéries gram-négatives sont colorées. On trouve donc des résultats inverses de la Réaction de GRAM classique, puisque, si l'on traite ensuite par un contre-colorant rouge, la safranine par exemple, les organismes gram-positifs

sont rouges et les organismes gram-négatifs violet noir. D'ailleurs, dans cette expérience, toutes les bactéries gram-négatives, même celles du groupe *B. Coli*, *Typhi*, *Dysenteri* de BENIANS se colorent en violet, ce qui contredit cet Auteur sur ce point.

En 1929, BURKE et BARNES attribuent la rétention du colorant à la taille accrue de la molécule « colorant + iode » et estiment que la différence essentielle entre les organismes gram-positifs et gram-négatifs réside dans la moindre perméabilité des cellules gram-positives à ce composé.

L'iode agirait d'abord en réduisant l'affinité du protoplasme pour les colorants, c'est-à-dire en diminuant son affinité colorante puis en augmentant le volume des molécules du colorant qui peuvent alors être retenues dans la cellule et enfin en rendant le colorant insoluble dans l'eau, ce qui empêche tout mélange de teinte avec le contre-colorant.

C) Critiques de la théorie physique de BENIANS et de BURKE.

1° SCHUMACHER (1926) (9) répétant l'expérience de BENIANS mais en écrasant les cellules préalablement colorées par la méthode de GRAM, observa que, dans ce cas, les débris de protoplasme résistent aussi longtemps que les cellules intactes. Donc, le fait de coaguler le protoplasme avant la dilacération de la cellule suffit à le rendre gram-positif. Dans cette expérience, d'autre part, la membrane ne joue aucun rôle.

2° Peut-on considérer la membrane comme un tamis ?

Somme toute, BENIANS et BURKE conçoivent la membrane comme un tamis qui ne laisse passer que les molécules de dimension inférieure à celle de ses mailles. STEARN et STEARN (1930) (8) ont fait remarquer que l'augmentation du poids moléculaire du complexe « violet + iode » par rapport au poids moléculaire du violet est trop faible pour que ce phénomène conditionne la perméabilité à travers la membrane.

D'autre part, ces deux Auteurs montrèrent que le complexe « colorant + iode » est dissocié en ses composants en solu-

tion alcoolique. Par conséquent cette conception de BURKE et BARNES ne peut guère se soutenir.

3° *L'iode est-il absolument nécessaire à la Réaction de Gram ?*

L'iode, BEGUER l'a démontré récemment (1929) (2), n'est nullement nécessaire à la réaction. En pratiquant celle-ci sans utiliser l'iode, on obtient des tons violacés plus pâles qu'avec le Gram classique mais parfaitement lisibles cependant. Or l'hypothèse de BENIANS et BURKE ne se soutient qu'en attribuant à l'iode un rôle indispensable.

D) **Travaux de KAPLAN M. L. et de KAPLAN L. (1933).**

KAPLAN et KAPLAN, dans l'exposé de leurs recherches personnelles, montrent tout d'abord la faible solubilité du complexe « violet-cristal + iode » dans l'alcool en mélangeant des solutions équimoléculaires des deux corps et en observant que le précipité est nettement visible à partir d'une concentration de 0,5 % de violet-cristal. Cette concentration équivaut au 1/10 environ de la solubilité donnée par le violet de gentiane, mélange complexe constitué essentiellement par du violet de méthyle et du violet-cristal.

La Réaction de GRAM revient à un ralentissement de l'extraction du colorant chez les bactéries gram-positives et aussi à un ralentissement de l'extraction de l'iode, c'est-à-dire à une faible perméabilité de la cellule à l'iode en solution alcoolique. Comme indication de l'importance de ce dernier facteur, KAPLAN et KAPLAN montrent que la décoloration des bactéries gram-négatives est empêchée par l'addition de 0,2 à 0,3 % d'iode à l'alcool et que l'alcool méthylique qui décolore presque instantanément la plupart des bactéries gram-positives perd son action brutale s'il est additionné d'une très petite quantité d'iode (0,01 %).

Les organismes gram-positifs présentent donc une basse perméabilité à l'iode en solution alcoolique. Ceci, combiné avec la faible solubilité dans l'alcool du complexe « colorant+iode »

est probablement la cause de la rétention du colorant par les cellules gram-positives dans la Réaction de GRAM.

KAPLAN et KAPLAN retrouvent donc les faits exposés par BENIANS en 1919-20, soit :

- **Organismes gram-positifs : basse perméabilité à l'iode.**
- **Organismes gram-négatifs : haute perméabilité à l'iode.**

Les Auteurs font dériver ensuite du fait que l'alcool iodé perd son pouvoir décolorant une méthode de mesure du degré de perméabilité à l'iode en solution alcoolique des cellules gram-positives. Ils mesurent le degré de positivité des bactéries gram-positives d'après la concentration d'iode dans l'alcool méthylique nécessaire pour arrêter la sortie de l'iode et du colorant de la cellule. Tant que l'alcool n'est pas étendu d'eau, chaque espèce bactérienne donne des résultats à peu près constants.

D'autre part, pour un même organisme, les différentes parties du corps cellulaire résistent inégalement à la décoloration. C'est ainsi, par exemple, qu'une souche de *B. Diphtérique* donne des granulations métachromatiques terminales gram-positives par l'emploi d'alcool contenant 0,01 à 0,02 % d'iode tandis que le reste du corps cellulaire exige de plus fortes concentrations d'iode.

KAPLAN et KAPLAN montrent ensuite que la résistance offerte au passage de l'iode par les limites externes des cellules gram-positives est mise en évidence, d'un autre côté, par les différences observées dans le comportement des organismes gram-positifs et gram-négatifs vis-à-vis d'un traitement par les alcalis faibles (hydroxyde de sodium 0,1 ou 0,2 N). Les organismes gram-négatifs sont facilement amenés à l'état de masse visqueuse tandis que les organismes gram-positifs résistent dans ces conditions (SMITH) (1922).

Ce fait indique une différence de structure entre bactéries gram-positives et gram-négatives.

Cependant le traitement par les alcalis dilués fait apparaître, chez les bactéries gram-positives et gram-négatives, des granulations qu'on met en évidence par les méthodes suivantes proposées par les Auteurs :

1) Colorer avec du bleu de méthylène et ensuite recouvrir avec la solution iodo-iodurée pendant une minute.

2) Colorer avec du violet-cristal et contre-colorer à la safranine pendant deux minutes.

En appliquant ces deux méthodes à un même organisme, l'expérience montre qu'on obtient des résultats absolument superposables. Or, dans le premier cas, les granulations foncées sont dues à l'impossibilité pour l'iode de pénétrer dans ces parties, et, dans le second cas, à l'impossibilité pour le violet-cristal de s'échapper de ces parties. Ceci montre le parallélisme pouvant exister entre les deux résistances.

Le B. Diphtérique, traité par ces deux méthodes sans traitement primitif par les alcalis, donne de bonnes images de granulations métachromatiques terminales.

KAPLAN et KAPLAN montrent aussi que la combinaison d'un colorant basique tel que le bleu de méthylène et d'un colorant acide tel que l'éosine ou l'érythrosine est susceptible de possibilités de différenciation excellentes.

Du *B. Coli* ayant subi l'action d'une très petite quantité d'alcali et traité par le bleu de méthylène et l'érythrosine se présente sous la forme d'une bactérie faiblement rose sur laquelle tranchent des granulations bleues.

Du *B. Subtilis* et d'autres bactéries sporulées perdent leur coloration initiale basique bleue et deviennent roses, montrant toutefois, cependant, des granulations rondes bleues à l'intérieur des cellules.

Les Bactéries gram-négatives, de leur côté, retiennent en général le colorant bleu primitif. Mais d'autres donnent un mélange de cellules bleues et roses.

Il n'y aurait donc pas de parallélisme entre les résultats donnés par cette double coloration et ceux fournis par la méthode de GRAM.

En conclusion, l'emploi de deux colorants, l'un basique, l'autre acide, semble ouvrir de nouvelles possibilités de différenciation des Bactéries, sans parallélisme néanmoins entre la résistance au déplacement d'un colorant par un autre et la résistance à la décoloration dans la méthode de GRAM.

II. LES THEORIES CHIMIQUES DE LA REACTION DE GRAM

A) Théorie de UNNA.

UNNA, en 1888 (2), donna la première explication théorique de la Réaction de Gram envisagée au point de vue chimique. Il considère l'iode comme un mordant, au sens chimique du mot, et admet que la coloration résulte d'une triple combinaison : « tissu + colorant + iode » qui n'est pas facilement dissociée par l'action de l'alcool. Les bactéries gram-négatives ne sont pas susceptibles de donner cette combinaison triple, aussi, dans leur cas, la décoloration est très rapide.

La théorie de UNNA, restée longtemps classique, fut très importante parce qu'elle permit à de nombreux chercheurs de travailler à la préciser. Elle n'indiquait nullement, en effet, quel constituant cellulaire entraînait en jeu.

Les substances auxquelles on a attribué la Réaction de GRAM se ramènent, en définitive, à deux groupes : les nucléoprotides et les lipides. On peut ajouter un troisième groupe, participant d'ailleurs des deux précédents : substances moins définies mises en évidence par diverses actions lytiques.

Nous allons passer en revue les travaux résultant de ces diverses conceptions.

B) La Réaction de GRAM et les nucléoprotides.

DEUSSEN (1918-1921) attribue la Réaction de GRAM aux nucléoprotides de la cellule.

Il constate tout d'abord que tous les traitements chimiques capables de détruire les nucléides et les nucléoprotides font également disparaître le caractère gram-positif d'une cellule. C'est ainsi qu'agissent les acides, les alcalis, les ferments protéolytiques (pepsine, trypsine, papaïne, etc...).

Les solvants des lipides utilisés à froid (alcool, éther, acé-

tone, benzol) ne peuvent pas faire disparaître ce caractère gram-positif.

Il présente d'autre part (1920) (2) une expérience synthétique montrant qu'on peut restituer son caractère gram-positif à une cellule rendue gram-négative par un traitement approprié.

Il utilise comme matériel d'étude la *Levure*, le *Staphylococcus Aureus* et le *Bacterium Mycoides* qu'il rend gram-négatifs par un traitement prolongé à la soude. Les cellules obtenues sont alors traitées par une solution de nucléinate de soude (solution d'acide nucléique ajoutée jusqu'à neutralité au tournesol à une solution de soude diluée dans laquelle sont maintenues les cellules). Il étale ensuite sur lame, laisse sécher, régénère l'acide nucléique dans les cellules par un traitement rapide à l'aide d'acide chlorydrique dilué, lave, sèche et pratique la coloration de GRAM.

Il constate que les cellules sont devenues gram-positives.

DEUSSEN conclut de tous ces faits que les nucléoprotides constituent le support de la Réaction de GRAM, mais il ne peut expliquer pourquoi les bactéries gram-négatives qui, pourtant, contiennent, elles aussi, des nucléoprotides sont cependant gram-négatives. Il n'explique pas non plus quel rôle joue l'iode dans la réaction.

En 1925, GUTSTEIN (3) montre qu'une préparation de levure traitée 24 heures par le Réactif de SCHWEITZER reste gram-positif. Cependant, traitées par le « bleu de méthylène + pyronine » (colorants typiques des nucléoprotides et de l'acide nucléique libre), les cellules paraissent incolores, les protides acides ayant dû être dissous par l'ammoniaque du réactif.

SCHUMACHER a démontré également le même fait.

On ne peut donc pas, en conclusion, attribuer aux nucléoprotides un rôle prépondérant dans la réaction de GRAM.

LA RÉACTION DE GRAM ET LES LIPIDES.

Les différents corps constituant ce vaste groupe, c'est-à-dire glycérides, phosphatides, stérides et lipoprotides ont été étudiés.

C) La Réaction de GRAM est attribuée à des glycérides.

1) Dès 1892, SCHMIDT remarque que le *B. Coli* et le *B. Lactis Aerogenes* observés dans un contenu intestinal riche en graisses ne se décolorent pas par le Gram. Sur contenu intestinal pauvre en graisses, ils se décolorent. L'auteur, voulant montrer qu'il s'agit bien des mêmes espèces, réussit à rendre le *B. Coli* gram-positif en le cultivant sur gélatine au beurre.

2) En 1911, DREYER, SCOTT et WALKER suggèrent que la Réaction de GRAM est due à un lipide puisque l'iode a une influence sur des substances ayant une affinité spéciale pour les colorants utilisés dans cette réaction. L'extraction prolongée du *Staphylocoque* par l'éther bouillant le rend gram-négatif. L'extrait éthéré obtenu, gram-positif, semble capable de rendre gram-positif le *B. Coli*. On arriverait au même résultat en traitant le *B. Coli* par une émulsion de lécithine.

3) En 1913, REICHERT assure que l'on peut faire perdre aux Bactéries leur caractère gram-positif par traitement avec les solvants des lipides tels que benzol, toluol, acétone, tétrachloréthylène.

4) En 1914, TAMURA traite à chaud des *Bacilles Diphtériques* secs par l'éther puis par l'alcool et les rend gram-négatifs. L'extrait lipidique obtenu, traité par l'alcool, donne un précipité blanc qui, étalé sur lames, prend le Gram.

5) CRITIQUES APPORTÉES A CES CONCEPTIONS :

De nombreuses critiques s'élevèrent contre le fait d'attribuer aux glycérides la résistance à la décoloration de cellules gram-positives. Les inclusions graisseuses sont, en fait, très rares chez les Bactéries, surtout à l'état jeune, c'est-à-dire quand elles prennent le Gram avec le plus d'intensité. Le traitement de la cellule par les solvants des graisses, d'autre part, ne peut suffire à lui enlever son caractère gram-positif.

Pour NIKITIN (1908), les solvants des graisses (alcool, éther, chloroforme), ne peuvent rendre gram-négatives les Bactéries.

EISENBERG, (1910) (3), estime qu'il est difficile de concevoir que la membrane des Bactéries soit formée ou imprégnée de graisses car il en résulterait une inhibition des échanges cellulaires difficile à concevoir dans des espèces à pousse rapide. Traitant le *B. du Charbon*, le *B. Subtilis*, le *B. Diphtérique*, le *B. Œdematiens maligni*, le *Staphylocoque*, les *Levures* et l'*Oidium lactis* par le chloroforme même à chaud, il ne peut pas les rendre gram-négatifs. Il y arrive par contre en les traitant à froid par le chlorure de benzoyle pendant 24 à 72 heures.

En 1918, DEUSSEN (1) critique les résultats de REICHERT en invoquant les phénomènes d'autolyse au cours du séjour des bactéries humides à l'étuve et en montrant que le traitement par le tétrachloréthylène peut faire disparaître le caractère gram-positif par la production d'acide chlorhydrique qui doit hydrolyser les nucléoprotides. Il constate d'autre part qu'il n'y a pas de relation entre l'indice d'iode et la faculté qu'ont certaines bactéries d'être gram-positives.

En 1920 (2), ainsi que nous l'avons vu page 41 et 42, il constate que les Bactéries traitées par les solvants des lipides (chloroforme, ligroïne, éther, solution de chloral à 67 %) et par le Réactif de SCHWEITZER restent gram-positives.

L'alcool et l'acétone, à température élevée et en présence d'eau rendent le *Staphylocoque doré*, le *B. Mycoides* et les *Levures* moins résistants. Le benzol, le toluol sont à peu près sans action à la température ordinaire.

Il remarque, d'autre part, que les traitements à chaud par les solvants des lipides sont critiquables car ils doivent amener des modifications chimiques des constituants cellulaires.

SCHUMACHER, en 1925 (4), estime que de simples traitements par les solvants des lipides ne suffisent pas à enlever à une cellule son caractère gram-positif.

La théorie de la réaction de GRAM attribuée uniquement aux lipides libres entraînables par un simple contact à froid avec des solvants organiques neutres ne résiste donc pas à l'examen critique des faits, les résultats des premiers auteurs se trouvant entachés d'erreur.

D) La Réaction de GRAM est attribuée à des phospholipides, lipoprotides, etc...

La Réaction de GRAM a été attribuée à des lipides plus complexes, tels les phospholipides (lécithides) qui peuvent exister dans la cellule, sous forme libre ou combinée à un protide basique et des lipoprotides qui ne sont pas directement solubles dans les solvants des lipides.

L'argument tiré de la conservation du Gram, après traitement par les solvants organiques, ne vaut pas contre eux.

1) En 1910, GUERBET, MAYER et SCHAEFFER émettent une hypothèse très importante : les corps gras contenus dans les Bactéries doivent participer à la Réaction de GRAM. « Les granulations se colorant par les colorations électives des graisses paraissent bien être celles sur lesquelles le Gram agit électivement ». Ils établissent, d'autre part, que les lipides à acides gras non saturés prennent le Gram beaucoup plus fortement que les lipides à acides gras non saturés par suite de la formation possible d'un produit d'addition (acide gras + iode). Le produit formé a des propriétés physiques nouvelles et en particulier pourrait former avec les matières colorantes utilisées dans la Réaction de GRAM (dérivés de la pararosaniline) un complexe insoluble dans l'alcool. Suivant cette hypothèse, si l'on sature les acides gras à fonction éthylénique, les lipides résultant ne doivent plus prendre le Gram. C'est ce qu'on a vérifié expérimentalement.

2) En 1910 également, EISENBERG (3) discutait cette conception et notait le travail de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER dans ses mémoires de 1912 et 1918.

3) En 1914, JOBLING et PATERSON attribuent la Réaction de GRAM à des lipides riches en acides gras non saturés et pensent que les lipides en cause sont unis à des protides. La teneur des Bactéries en lipides à acides gras non saturés est proportionnelle à leur résistance à la digestion trypsique.

4) En 1916, KENDALL confirme les résultats de EISENBERG et attribue aux lipoprotides de la membrane la Réaction de GRAM. Ces lipides seraient constitués de graisses non saturées, des

phosphatides. Mais c'est à GUTSTEIN, à SCHUMACHER et à STEARN et STEARN que nous devons les travaux décisifs sur la question.

5) En 1924, GUTSTEIN (2) rend gram-négatives les cellules de *levure* en les traitant à chaud pendant deux heures par de l'acide chlorhydrique à 2 % et en dégraissant ensuite par le benzol, l'alcool absolu pendant 24 heures. Nous avons vu précédemment (page 42) que le même auteur, en 1925 (3), traitant des cellules de *levure* par le Réactif de SCHWEITZER sans les rendre gram-négatives conclut que la réaction de Gram n'est pas due à un nucléoprotide. Il ajoute, au sujet de son expérience de 1924 citée plus haut, qu'il suffit d'une durée de contact de vingt minutes de HCl à 2 % pour rendre la cellule gram-négative.

Il attribue le caractère gram-positif à un lipide acide soluble dans l'alcool (après hydrolyse) et colorable par les colorants basiques.

6) SCHUMACHER de 1923 à 1928 a abordé le problème avec les méthodes de l'histochimie. Cet Auteur a recherché, en effet, quels étaient les colorants pouvant caractériser des espèces chimiques bien définies dans une cellule. Il commença par établir ou confirmer que les colorants usuels utilisés en bactériologie pouvaient être séparés ainsi, d'après leurs affinités colorantes :

a) **Des colorants spécifiques des nucléides et des nucléoprotides.**

Les plus importants sont la *pyronine*, le *bleu de méthylène*, le *vert de méthyle*. Ces colorants n'ont aucune affinité pour les lipides.

b) **Des colorants spécifiques des lipoïdes.**

On peut citer la *fuchsine basique*, le *vert malachite*, le *bleu Victoria*. Ces corps, solubles dans les lipides, ne colorent dans la cellule que les lipides ou les lipoprotides.

SCHUMACHER a plus particulièrement étudié le *bleu Victoria* dont la base, insoluble dans l'eau, colore cependant la cellule grâce à ses lipides. Cette coloration résulterait, non d'un phénomène d'adsorption, mais d'une combinaison chimique avec les fonctions acides du lipide.

La démonstration de cette combinaison, c'est-à-dire de cette réaction chimique a été faite fort élégamment par SCHUMACHER en 1925 (4) grâce à la propriété qu'ont les sels du bleu Victoria d'être de teinte différente (bleu) de la teinte de la base (rouge) : une suspension de lécithine dans l'eau est traitée par une solution éthérée de la base du bleu Victoria. Une centrifugation montre l'éther décoloré et le culot de lécithine est coloré en bleu.

D'autre part, en traitant une solution éthérée de lécithine par une solution aqueuse de bleu Victoria (à l'état de chlorhydrate), on peut caractériser dans la couche aqueuse la présence de HCl.

On peut résumer ainsi ces deux expériences :

- 1° Base du bleu Victoria + Lécithine = Lécithinate de bleu Victoria.
(rouge) (bleu)
- 2° Bleu Victoria (en chl^{te}) + Lécithine = Lécithinate de bleu Victoria
+ HCl

SCHUMACHER a donc pu obtenir ce point très important : les colorants d'aniline ne sont pas des colorants diffus. Ils constituent les réactifs spécifiques d'espèces chimiques bien définies. La coloration résulte d'une combinaison chimique et non d'un phénomène d'adsorption.

SCHUMACHER étudie alors la colorabilité de la cellule de *levure*. Les colorants des deux groupes précédents étant susceptibles de la colorer, elle contient donc lipides et nucléoprotides. Traitant cette cellule à froid par l'alcool, l'éther, l'affinité colorante pour les deux groupes n'a pas varié. En particulier, le GRAM reste positif. Donc, les lipides de la cellule de *levure* existent aussi à l'état combiné, probablement de lipoprotides.

Cette même suspension, débarrassée des lipides libres, fut traitée ensuite par l'acide chlorhydrique dilué, à froid, pendant deux heures. Dans ces conditions, les nucléoprotides sont hydrolysés et dissous. Le bleu de Méthylène, par exemple, ne colore plus la cellule, mais le Gram reste positif.

SCHUMACHER (1928) en conclut que les nucléoprotides ne sont pas la cause, du moins la cause exclusive, de la Réaction de GRAM.

Faisant suivre ce traitement d'un traitement à l'alcool chlorhydrique à froid, la combinaison lipoprotidique est détruite et les acides lipoïdiques libérés se trouvent en solution dans l'alcool. On n'obtient plus aucune coloration par les colorants basiques et le Gram est devenu négatif.

Le mélange de lipides isolés, traité in vitro par la méthode de GRAM, reste coloré.

SCHUMACHER put ensuite fragmenter ce mélange et en isoler un lipide Gram-positif, grâce à sa propriété d'être soluble dans l'éther et insoluble dans l'alcool chaud.

Ce lipide, de constitution chimique mal connue, est probablement constituée d'un acide glycéro-phosphorique, à radicaux d'acides gras non saturés, probablement combiné à des noyaux sucrés. On a pas pu en isoler de la choline. Ce ne serait donc pas un lécithide. La présence d'acides gras non saturés s'accorde parfaitement avec l'hypothèse de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER.

Restitution du caractère gram-positif aux cellules qui l'ont perdu.

Les cellules de *levure* devenues gram-négatives, au moyen des traitements précédemment décrits, furent soumises par SCHUMACHER à l'action de divers lipides : lécithide et céphalide du cerveau, lécithide de la levure, lipides bruts extraits de la levure par l'éther chlorhydrique. Seule, cette dernière substance donne un résultat positif et très faible. On n'obtient en effet qu'une teinte violet pâle et non violet noir, comme dans la coloration typique. Cependant certains constituants de l'extrait ont contracté dans la cellule une combinaison chimique car la réaction reste positive après de nombreux lavages à l'alcool.

Pour résumer les données de SCHUMACHER, on peut dire que, tout en ne niant pas le rôle possible des nucléoprotides ni le rôle possible de la membrane dont la perméabilité règle la pénétration des réactifs, il attribue surtout la réaction aux lipoprotides contenant des radicaux d'acides gras non saturés.

III) LA THEORIE PHYSICO-CHIMIQUE DE STEARN E.-W. ET STEARN A.-E.

A) Exposé de la théorie.

Ces Auteurs ont étudié (1923-30) les colorations bactériennes en tenant compte des connaissances dues à J. LOEB sur le comportement différent des protides de part et d'autre de leur point isoélectrique.

Ces corps fonctionnant comme des ampholytes se comportent comme des bases faibles du côté acide (et manifestent alors de l'affinité pour les colorants acides) et comme des acides faibles du côté alcalin (et manifestent alors de l'affinité pour les colorants alcalins). Comme la cellule normale a une réaction très faiblement acide, c'est-à-dire située du côté alcalin du point isoélectrique des protides cellulaires, elle n'a d'affinité que pour les colorants basiques. Le traitement par les alcalis augmente par conséquent l'affinité de ces colorants basiques pour la cellule et inversement le traitement par les acides la diminue mais augmente l'affinité des colorants acides pour la même cellule.

Le point isoélectrique d'une cellule pourra se déterminer expérimentalement en essayant sur elle divers colorants de l'un ou l'autre groupe répartis en solutions de pH variés et maintenus constants par des tampons.

Le raisonnement précédent ne s'applique qu'aux protides, mais les autres constituants de la cellule peuvent fonctionner également comme des ampholytes. Leur point isoélectrique peut se placer fort différemment. C'est ainsi que les lipides ont leur point isoélectrique dans une région fortement acide.

Ces données étant établies, on peut diviser l'échelle des pH en 3 régions différentes :

a) la région très acide où lipides et protides sont du côté acide de leur point isoélectrique et ne présenteront d'affinité que pour les colorants acides.

b) la région comprise entre les points isoélectriques des

deux principaux constituants cellulaires (lipides et protides). Dans cette région, les réactions colorantes seront peu précises puisque les lipides se comportent comme des acides et les protides comme des bases. Cette interaction aboutit à la formation d'un complexe lipoprotidique neutre, sans affinité colorante (région isoélectrique).

c) la région située du côté alcalin du point isoélectrique des constituants cellulaires les moins acides. Seuls les colorants basiques auront de l'affinité pour la cellule.

La zone intermédiaire varie avec chaque cellule suivant sa composition chimique, et, pour une même cellule, varie avec son évolution puisque sa composition chimique varie.

STEARN E.-W. et STEARN A.-E. ont pu montrer que la zone isoélectrique des bactéries gram-positives (*B. Subtilis*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Pyogenes*) est comprise entre pH 2 et 3.

Celle des bactéries gram-négatives serait plus étendue : pH 2 à 5.

Ces Auteurs font jouer à l'iode, dans la réaction de GRAM, un rôle d'oxydant faible qui tendrait à acidifier la cellule, donc à déplacer son point isoélectrique du côté acide, donc à accroître son affinité colorante pour des colorants basiques. Les espèces gram-positives seraient, d'après cette conception, beaucoup plus oxydables que les espèces gram-négatives.

Cette théorie s'accorde bien avec l'hypothèse de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER, de JOBLING et PATERSON, de SCHUMACHER, qui pensent que l'iode sature les liaisons éthyléniques d'acides gras non saturés en les transformant en acides saturés, plus forts au point de vue chimique.

Ce résultat ne vaut naturellement qu'autant que la réaction finale de la cellule reste dans la région neutre ou faiblement alcaline. C'est ainsi qu'une solution ancienne d'iode, donc acidifiée, décolore les bactéries gram-positives et qu'au contraire, ces divers réactifs agissant en milieu alcalin rendent la réaction moins fragile. (Résultat de BURKE, 1922, avec le bicarbonate de sodium, etc...).

STEARN E.-W. et STEARN A.-E. optent donc pour une théo-

ries physico-chimique de la réaction de GRAM. Ils ont démontré que la théorie physique de BURKE et BARNES (Membrane-crible) ne reposait sur rien puisque le composé « colorant + iode » est dissocié en ses composants en solution alcoolique.

B) Critiques de BURKE et BARNES (1929).

BURKE et BARNES (1929) dénie à l'iode ce rôle d'oxydant faible dont le but serait de déplacer suffisamment le point iso-électrique du côté acide pour que les organismes gram-positifs soient capables de fixer les colorants acides. Dans ce cas, en effet, tout autre oxydant faible agirait de la même façon. BURKE et BARNES firent des réactions de GRAM en remplaçant la solution iodo-iodurée par de l'eau oxygénée qui ne donne aucun précipité avec le colorant et contre-colorent ensuite à la safranine, ce que n'avaient pas fait STEARN et STEARN. Les cellules prennent la teinte du contre-colorant. Si l'on pratique ensuite une réaction de GRAM classique, on trouve ces cellules gram-positives. Donc l'eau oxygénée ne saurait remplacer l'iode.

Pour qu'un oxydant puisse se substituer à l'iode, il faut qu'il forme un précipité avec le colorant, indépendamment du cytoplasme, tel le bichromate de potassium qui donne un précipité insoluble dans l'eau et soluble dans le décolorant. C'est ainsi que le permanganate de potassium ne peut servir dans la réaction puisque le précipité qu'il donne avec le colorant est insoluble dans le décolorant.

D'un autre côté, BURKE et BARNES montrent que l'iode n'agit pas seulement par une action oxydante : des préparations de *Levure* sont traitées par la solution iodo-iodurée et on élimine l'iode par lavages à l'eau, l'acétone, l'eau acidulée. Une réaction de GRAM est pratiquée ensuite, mais sans utiliser la solution iodo-iodurée. Les *Levures* sont gram-négatives. En pratiquant ensuite sur les mêmes préparations décolorées par l'acétone une réaction de GRAM classique, les cellules sont gram-positives.

BURKE et BARNES en concluent que l'iode n'agit pas par son action oxydante, car celle-ci se serait exercée dans son application préalable.

CHAPITRE V

LE SIEGE DE LA REACTION DE GRAM

Les substances gramophiles envisagées par les différents Auteurs ne sont pas localisées dans toute la cellule.

Pour SCHUMACHER, les lipoprotides gram-positifs sont localisés surtout dans l'endoplasme. Les partisans de la théorie chimique, comme BENIANS, BURKE, attribuent eux aussi le rôle prépondérant à l'endoplasme. EISENBERG, GUTSTEIN, CHURCHMAN, KEMP, au contraire, estiment que la coloration a pour siège la membrane à laquelle ils donnent d'ailleurs des noms variés. On peut rappeler, à ce sujet, ce fait bien connu des bactériologistes que les bactéries colorées par la méthode de Gram paraissent plus grosses que par les autres méthodes de coloration. Ainsi la Réaction de GRAM serait le résultat de la coloration d'un constituant cellulaire occupant la périphérie de la cellule et échappant aux autres colorants.

I° L'ECTOPLASME DE EISENBERG.

ZETTNOW, en 1899, appela « **Ectoplasme** », non pas la membrane, mais la partie la plus externe du cytoplasme. A la suite, beaucoup d'auteurs employèrent ce nom, mais en modifiant cette signification originale. C'est ainsi qu'EISENBERG, en 1909 (1), entend par « **ectoplasme** » la couche cytoplasmique la plus externe et la membrane. Selon lui, la capsule fournie par la *bactéridie charbonneuse* se trouvant dans les humeurs d'un animal réfractaire n'est qu'une hypertrophie de l'ectoplasme. LEGROUX et MAGROU, en 1920, adoptent cette manière de voir quand ils voient dans l'ectoplasme l'origine de la substance interstitielle donnant aux colonies leur cohésion et leur structure

organoïde compliquée. Par contre, COUDRAY, en 1929, dans une thèse inspirée par LASSEUR, assimile l'ectoplasme de ZETTNOW à la capsule des naturalistes.

EISENBERG (1909 à 1919) a mis l'ectoplasme en évidence par la méthode de CLAUDIUS (coloration par le violet de gentiane, mordantage par l'acide picrique, différenciation par le chloroforme) dans laquelle il prolonge la différenciation. La zone externe reste seule colorée et il l'appelle « **ectoplasme** ». Les bactéries gram-négatives, traitées dans les mêmes conditions, ne présentent pas cette zone colorée. Chez les bactéries gram-positives, ce sont les cellules les plus âgées qui présentent le plus nettement cet « **ectoplasme** ». Les cellules jeunes, au contraire, sont uniformément colorées.

Puisque cette région résiste le plus longtemps à la décoloration, EISENBERG en fait tout naturellement le siège de la réaction et attribue le peu de résistance à la décoloration de l'endoplasme, selon les vues de BRUDNY, à la faible densité de cette partie du protoplasme.

Ensuite, EISENBERG attribue aux lipides et lipoprotides de l'ectoplasme son caractère gram-positif.

II° LE RÔLE DE L'ECTOPLASME DANS LA RÉACTION DE GRAM, D'APRÈS GUTSTEIN (1924 à 1927).

GUTSTEIN a décrit une méthode nouvelle de coloration de l'ectoplasme. Après fixation, mordantage par une solution de tanin à 5 %, on colore par une solution aqueuse de vert malachite à 1 %. On peut contre-colorer ensuite avec un colorant de teinte complémentaire, par exemple au moyen de fuchsine diluée.

Dans ces conditions, seules les bactéries gram-positives présentent une zone externe colorée en vert, la partie centrale étant incolore ou colorée en rose si on a contre-coloré par la fuchsine. L'ectoplasme des bactéries gram-négatives n'est pas coloré en vert, mais on peut le colorer cependant, en mordantant avec une solution de tanin six fois plus concentrée.

Les colorants basiques d'aniline, d'autre part, peuvent remplacer le vert malachite.

GUTSTEIN ayant mis ainsi en évidence un « ectoplasme » a recherché quel rôle celui-ci pouvait jouer dans la réaction de GRAM. Il a constaté qu'il était fortement gram-positif et que la cellule privée de cet ectoplasme par voie physique (écrasement et dilacération de la cellule) ou par voie chimique (traitement par l'alcool chlorhydrique) devenait gram-négative.

Selon GUTSTEIN, l'ectoplasme comprend la membrane et la partie externe de l'endoplasme. Il serait constitué chimiquement :

1° d'une substance basique, colorable par les colorants acides (vert de Guinée) et que les colorants basiques ne colorent qu'après mordantage au tanin.

2° d'un lipide acide, mis en évidence par le bleu Victoria et par les colorants basiques. C'est essentiellement la substance gramophile enlevée par traitement à l'alcool chlorhydrique.

La réaction de GRAM, selon GUTSTEIN, résulterait donc d'une combinaison triple : **colorant + iode + lipide acide insoluble ou peu soluble dans l'alcool**. Le complexe « colorant + iode + lipides » des bactéries gram-négatives serait soluble ou facilement dissocié par l'alcool.

III° CRITIQUES DE SCHUMACHER A LA THÉORIE DE GUTSTEIN.

THÉORIE DE L'ENDOPLÂSME DE SCHUMACHER : SCHUMACHER reproche à GUTSTEIN l'emploi injustifié du mot « ectoplasme » car il s'agit en réalité de la membrane.

Il démontre ensuite que la membrane ne joue aucun rôle dans la réaction et que les lipides acides sont localisés dans l'endoplasme :

1° les colorations vitales au moyen de la base du bleu Victoria ne colorent pas la membrane, donc absence de combinaisons lipoprotidiques.

2° une émulsion de cellules de levure de boulanger étant placée sur la table d'un microtome à congélation, on pratique des coupes de 6 μ d'épaisseur. On remet en suspension dans l'eau le matériel sectionné. On lave par centrifugation. Le culot étalé sur lames et coloré par la Méthode de GRAM, montre, à côté de cellules intactes Gram-positives, des membranes

vides de leur contenu et non colorées. Le contenu cellulaire qui est passé dans l'eau de lavage, étant précipité par le ferrocyanure de potassium acétique, est coloré par le Gram après lavage. Il est gram-positif.

3° en utilisant la technique de BENIANS (broyage en présence d'abrasifs) sur des cellules non fixées et en pratiquant ensuite la réaction de GRAM, on retrouve les résultats précédents.

Mais la méthode de SCHUMACHER s'adresse à des cellules vivantes alors que la méthode de Gram colore des cellules mortes. Pour répondre à cette critique, SCHUMACHER fit remarquer alors qu'en pratiquant la méthode de GRAM sur des cellules vivantes mais en prolongeant l'action des réactifs violet de gentiane et iode jusqu'à 24 heures, les cellules ont leur cytoplasme coagulé et elles sont gram-positives. Des coupes pratiquées à ce moment montrent :

- 1° des cellules intactes gram-positives.
- 2° des membranes vides gram-négatives.
- 3° des masses amorphes d'endoplasme gram-positives.

Le conflit entre GUTSTEIN et SCHUMACHER tient, en réalité, à l'emploi injustifié par GUTSTEIN, du mot « ectoplasme ». Il englobait sous ce nom la membrane et la partie externe de l'endoplasme.

SCHUMACHER opérant sur du matériel vivant, a mis de plus en évidence l'existence, avant la membrane, d'une fine couche de substance lipidique (faible coloration bleue par le bleu Victoria) qu'il appela « **kittsubstanz** » c'est-à-dire « **substance limitante** ». On a donc, de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur :

1° l'**endoplasme** dont la partie externe peut se trouver très riche en lipides et qui prend le gram. (Coloration positive avec le bleu Victoria).

2° la **membrane**, gram-négative, (coloration négative avec le bleu Victoria).

3° la « **kittsubstanz** », (coloration positive avec le bleu Victoria).

En résumé, SCHUMACHER et GUTSTEIN concluent tous deux de leurs travaux que la substance gramophile est constituée

par des lipides acides. Ils divergent seulement d'opinion au sujet de la localisation de ces substances :

1° dans l'endoplasme pour EISENBERG.

2° dans l'ectoplasme pour GUTSTEIN.

IV. RECHERCHES DE KEMP (1931).

Plus récemment, KEMP reprit la question sous un angle analogue et aboutit à des résultats opposés à ceux de EISENBERG. Des étalements épais de *levure* étant desséchés, il les écrase entre lame et lamelle et les colore ainsi : action pendant 1 minute $\frac{1}{2}$ d'une solution de violet-cristal puis action pendant 2 minutes de la solution d'iode, différenciation au moyen d'huile d'aniline non diluée et contre-coloration à la safranine. Les résultats obtenus, présentés sous forme de microphotographies, montrent que la zone la plus externe des cellules broyées est restée gram-positive tandis que la région interne est devenue gram-négative.

V. LE CORTEX GRAM-POSITIF DE CHURCHMAN.

CHURCHMAN (1929) (7) distingue dans toute bactérie gram-positive, 2 zones bien distinctes :

1° un cortex gram-positif.

2° une moëlle gram-négative.

Il dissout le cortex à l'aide d'acriviolet (expérience sur le *B. Anthracis* » ou par chauffage prolongé à 52° (expérience sur certaines races de *Staphylococcus aureus*).

CHURCHMAN conclut à l'élimination du **cortex** parce que les bactéries sont devenues gram-négatives et ont diminué de volume et de poids.

On ne peut guère suivre l'auteur dans cette voie. L'autolyse en effet s'exerce toujours aux dépens du cytoplasme et non de la membrane. La diminution de volume, d'autre part, provient de la rétraction de cellules vidées partiellement de leur contenu et non de la diminution de leur diamètre.

Ces résultats n'ont pu d'ailleurs être retrouvés par l'auteur sur la *levure* qui est pourtant fortement gram-positive.

DEUXIEME PARTIE

EXPOSÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE 1^{er}.

SUBSTITUTION D'UNE ETUDE QUANTITATIVE À L'ETUDE QUALITATIVE DE LA REACTION DE GRAM. IMPORTANCE DES TRAVAUX DE NEIDE

La méthode de GRAM, employée communément comme coloration différentielle des bactéries, est donc encore douteuse dans son mécanisme, malgré le temps considérable qui s'est écoulé depuis sa découverte et le grand nombre de travaux que nous venons de résumer.

Notre attention fut vivement attirée, lors de l'étude critique de ces travaux, par les résultats de NEIDE (1904) exposés brièvement dans la 1^{re} partie de notre travail (p. 25). Cet Auteur introduisait en effet le premier la notion de « **Gram-Daüer** » ou « **Durée de décoloration** » en montrant qu'entre les cellules gram-positives et gram-négatives, il n'y avait qu'une différence de résistance à la décoloration. Un réactif convenable, agissant plus ou moins longtemps, peut en effet décolorer les cellules les plus fortement gram-positives.

Lorsqu'on examine, dans ces conditions, la réaction de GRAM, on ne peut plus parler, théoriquement, de bactéries

gram-positives ou gram-négatives. A cette notion qualitative et rudimentaire, de la réaction se substitue une notion quantitative beaucoup plus précise : la résistance à la décoloration se mesure par le temps nécessaire pour débarrasser complètement (ou presque complètement) une cellule du complexe gram-positif qu'elle retenait.

La détermination du « **Gram-Daüer** » amena NEIDE à mettre au point une technique d'expérimentation rigoureusement précisée. Il cherchait en effet à utiliser la réaction de GRAM comme caractère spécifique d'une espèce donnée. Pour cela, il lui fallait disposer d'un test de décoloration et déterminer s'il existait des limites entre lesquelles une espèce se décolorait.

NEIDE établit d'abord la variation de résistance à la décoloration, pour une même bactérie, avec ses divers stades de développement. Les spores et les ébauches de spores, notamment, présentent une résistance très grande. Il établit aussi que l'usage d'un contre-colorant servant à distinguer les cellules gram-négatives des cellules gram-positives amenait de grosses erreurs. Comme la décoloration complète, d'autre part, était longue à obtenir et amenait elle aussi des causes d'erreurs par suite de la difficulté de lecture des préparations, NEIDE adopta pour test de décoloration, ainsi que nous l'avons signalé page 24, un ton violet pâle qu'il donna dans une planche, en face de la page 521 de son travail.

Choisissant alors ce test de décoloration comme caractère spécifique d'une espèce donnée, NEIDE étudia l'influence des divers facteurs intervenant dans la régularité des résultats et régla sa méthode de façon à ce que les expériences fussent régulièrement reproduisibles. Il s'arrêta à la technique suivante :

Cultures en stries sur gélose d'espèces sporulées maintenues à l'étuve à 28° jusqu'à ce que les oïdies montrent les premières ébauches des spores (18 heures pour *B. Tumescens*, par exemple), émulsion des colonies dans l'eau, étalement, fixation par séjour de 5 minutes à l'étuve sèche à 40°. Coloration en tube chauffé à 80° avec le violet de méthyle BB de HÖCHST

dont il donne la formule suivante : Partir d'une solution saturée du colorant dans l'alcool à 95° (qui contient 10 gr. de colorant pour 20 cc. d'alcool). Mélanger 4 cnc de cette solution avec 100 cc. d'une solution d'aniline à 4 % suivant EHRLICH. Abandonner 12 heures au repos. Renouveler le colorant pour chaque essai. Ne pas conserver plus de 7 jours cette solution.

Après 2 minutes de contact, essorer le colorant avec du papier-filtre et plonger les préparations dans la solution iodo-iodurée (1-2-300) renouvelée chaque jour et remplacée après chaque essai. Laisser agir 2 minutes, essorer et plonger les préparations dans l'alcool à 80° maintenue à 28° à l'étuve.

Les principaux résultats de NEIDE furent les suivants :

1° Confirmation des travaux de CZAPLEWSKI et de GRIMME sur la moindre résistance des vieilles cultures;

2° Influence des milieux de culture : le transport d'une espèce de son milieu naturel sur une gélose sucrée modifie totalement ses conditions de nutrition;

3° Influence du mode d'étalement de l'émulsion : les individus provenant d'émulsions trop épaisses sont beaucoup plus longs à se décolorer;

4° Influence de la fixation :

a) Un chauffage prolongé à 40° (15 minutes au lieu de 5) diminue beaucoup la résistance à la décoloration;

b) Irrégularité des résultats obtenus avec la fixation par la flamme.

5° Influence de la durée et de la température du colorant : l'augmentation de ces deux facteurs augmente toujours la durée de la décoloration;

6° Influence de la solution iodo-iodurée :

a) *Age de la solution* : les solutions conservées en flacons bien bouchés se conservent assez longtemps.

b) *Durée de contact. Concentration* : l'augmentation de ces deux facteurs augmente la durée de la décoloration.

C'est ainsi que le *B. Tumescens* traité 2 minutes par la solution iodo-iodurée résiste 1 h. 1/4 à la décoloration, tandis qu'il résiste 2 h. 1/4 s'il est traité 5 minutes par la même solution.

c) *Température de la solution iodo-iodurée* : l'augmentation de ce facteur est si importante qu'on peut arriver à rendre gram-positives des bactéries normalement gram-négatives, telles que *Spirillum volutans*, *B. Pyocyaneus*, *B. Coli*, *B. Typhosus*, *B. Influenza*, etc...

7° Influence de la conservation prolongée du matériel à décolorer : l'auteur trouve de très grandes variations suivant l'espèce.

Cette brève énumération montre l'intérêt qui doit s'attacher aux travaux de NEIDE. Mais le résultat le plus intéressant est la détermination de la durée de décoloration des diverses espèces.

En possession de sa technique, l'auteur chercha en effet à fixer ce facteur pour chaque espèce. A vrai dire, il dut se contenter de fixer les limites entre lesquelles il peut varier, ce qui nécessita l'étude de nombreuses préparations obtenues sur plusieurs cultures.

Dans ces conditions, et compte tenu de ces réserves, le « **Gram-Daüer** » devenait pour une espèce donnée un facteur relativement constant et caractéristique. C'est ainsi qu'il obtint, pour les bactéries sporulées suivantes, les chiffres ci-dessous :

BACILLUS	SUBTILIS		Gram-Daüer		140 minutes
—	LACTICOLA		—		75
—	TUMESCENS		—		75 —
—	MEGATHERIUM		—		40 —
—	ROBUR		—		35 —
—	SILVATICUS		—		30 —
—	ALVEI		—		7

L'intérêt primordial de sa méthode semble donc avoir été, pour NEIDE, la démonstration de la possibilité d'ajouter un facteur supplémentaire à la diagnose d'une espèce bactérienne donnée. Il ne suffirait plus désormais d'attribuer à une bactérie la qualité gram-positive, mais il conviendrait d'exprimer par un chiffre qu'elle est faiblement ou fortement gram-positive. Cette détermination pourrait s'ajouter aux nombreuses recherches à pratiquer pour diagnostiquer une

espèce, telle par exemple, la morphologie macroscopique des cultures, microscopique de la bactérie, l'étude des fermentations des glucides, etc... A titre de comparaison, NEIDE voyait dans la détermination de ce facteur, constant pour chaque espèce, l'équivalent de la recherche d'une constante physique, par exemple le point de fusion dans la détermination d'un produit chimique.

Ce travail introduisant la notion de durée de décoloration, substituant les recherches quantitatives aux recherches purement qualitatives, marque une étape importante, à notre avis, dans l'étude de la Réaction de GRAM. Cependant, un examen attentif des résultats obtenus par NEIDE montre que, malgré la précision de la technique utilisée, il est nécessaire de pratiquer de nombreuses numérations, la durée de décoloration n'étant que la moyenne des chiffres trouvés. Des variations individuelles peuvent donc intervenir, parmi les divers individus d'une même population ? Ce point mérite une étude approfondie puisqu'il met en doute la valeur même du « **Gram-Daüer** ». L'auteur, d'autre part, ne s'est soucié que du résultat, négligeant les temps intermédiaires de la décoloration.

Il nous a donc paru utile de reprendre la question, non seulement de façon à préciser la fin de la décoloration, mais en la suivant dans toutes ses phases. Il est nécessaire, dans ces conditions, de partir d'un organisme gram-positif de grande taille, tel que la cellule de *levure*, en mettant au point une technique de coloration et de décoloration rationnelle.

L'exposé de nos recherches personnelles comprend donc d'abord l'établissement de la technique d'expérimentation, puis ses applications à l'étude de la décoloration de cellules de *levure*, de la variation de la vitesse de décoloration suivant les agents fixateurs et l'âge des cellules. Dans une dernière partie, nous avons appliqué notre technique à l'étude analytique de l'influence des principaux constituants cellulaires sur la résistance à la décoloration, ce qui nous a permis de confronter nos résultats avec ceux obtenus par différents auteurs ayant utilisé d'autres méthodes.

CHAPITRE II.

ETABLISSEMENT DE LA TECHNIQUE

La détermination de la technique à employer exige beaucoup de minutie pour que toutes les expériences soient comparables. Pour suivre la décoloration de cellules de *levure* colorées par la méthode de GRAM, nous devons satisfaire aux points suivants :

1° Obtenir un grand nombre de préparations identiques au point de vue éléments cellulaires, fixation, coloration, action du réactif de différenciation;

2° Les retirer du bain du réactif différenciateur à intervalles croissants, réguliers et connus;

3° Compter sur toutes les préparations obtenues, les cellules restées gram-positives et celles qui sont devenues gram-négatives. (Choix d'un test de décoloration);

4° Etablir la courbe de décoloration représentant graphiquement le phénomène.

1° MATÉRIEL D'ÉTUDE.

Nous avons utilisé des cellules de *Levure* car cet organisme, par sa grosseur, facilite le travail. Il est facile à cultiver, facile à étaler régulièrement, en opérant comme avec une goutte de sang et il est fortement gram-positif.

La souche de *Levure* (*Saccharomyces pastorianus*) qui a servi à nos expériences provient de la collection de la Faculté de Pharmacie. Le milieu de culture choisi pour nos expériences est la carotte préparée ainsi : débiter les carottes en tranches et les tremper une heure dans une solution de soude à 5 %; Cuire 45 minutes à 120°.

Après ensemencement, les cultures sont maintenues 48 heures à l'étuve à 24° et sont assez abondantes pour qu'il soit possible de les râcler sans entraîner le substratum nutritif.

2° PRÉPARATION DES ÉMULSIONS.

On râcle la culture à l'aide d'une anse de platine et on l'émulsionne ensuite, aussitôt, dans 20 cc. d'eau distillée parfaitement limpide (eau bidistillée puis filtrée à la bougie Chamberland n° 9) contenus dans un tube à centrifuger. L'émulsion est lavée à l'eau à plusieurs reprises par centrifugations successives, peu rapides, pour éviter toute déformation des cellules. Le culot est ensuite essoré et fixé en bloc avec le réactif choisi pendant le temps nécessaire.. (Pour les expériences d'essai, il s'agissait d'alcool-éther). On y arrive en recouvrant entièrement le culot de levure avec le fixateur, en dissociant rapidement le culot dans le réactif et en agitant pendant toute la fixation (2 cc. environ de réactif fixateur sont nécessaires). On arrête la fixation à l'instant choisi en ajoutant la grande quantité d'eau nécessaire à rétablir l'équilibre primitif du tube à centrifuger. Une centrifugation assez rapide rassemble en quelques secondes les cellules fixées. On remplace le mélange (fixateur 2 cc. + eau 18 cc. environ) par de l'eau bidistillée et on lave à plusieurs reprises par centrifugations successives.

En ayant soin de râcler un certain nombre de tubes de culture, on se trouve alors en présence d'une grande quantité de cellules fixées et cela va permettre d'obtenir un grand nombre de préparations certainement identiques.

3° PRÉPARATION DES ÉTALEMENTS.

Les lames de verre qui serviront aux étalements doivent être très propres, débarrassées absolument de toute matière grasse. On y arrive en les traitant par le mélange chromique et en les conservant dans l'alcool ammoniacal. Au moment de l'emploi, passer chaque lame dans la flamme d'un bec Bunsen.

L'émulsion doit être étalée très régulièrement et cela est conditionné par la propreté des lames. Il faut s'attacher à obtenir des préparations homogènes, assez denses pour faciliter les numérations ultérieures, mais sans amas de cellules où l'action du décolorant serait ralentie, ce qui entacherait d'erreur les résultats. L'idéal est d'obtenir des préparations analogues à des lames de sang bien étalées, c'est-à-dire où les cellules sont très voisines, mais ne chevauchent pas. On peut y arriver en utilisant l'anse de platine ou une lamelle de verre. Il convient d'éviter l'écrasement des cellules car, en ce cas, la vitesse de décoloration se trouverait grandement modifiée.

Faire 2 étalements par lame.

A la température du laboratoire, les préparations sèchent vite. Elles se conservent très bien ensuite pendant toute la durée des expériences dans des boîtes à rainures.

La technique de préparation étant ainsi fixée dans tous ses détails, il est facile, si besoin est, de reproduire des étalements comparables.

On pourrait craindre que, préparés ainsi, ces étalements ne soient pas très adhérents aux lames de verre et que les lavages successifs les entraînent en totalité ou en partie. La méthode employée comporte en effet un certain nombre de traitements dans différents liquides, mais l'expérience a montré que l'adhérence était suffisante.

4° COLORANT. SOLUTION IODO-IODURÉE. DÉCOLORANT.

Il est évidemment indispensable d'utiliser pour toutes les expériences le même colorant. Nous sommes partis du **violet de gentiane** GRÜBLER qui nous a donné toute satisfaction et nous en avons fait rentrer au laboratoire une quantité suffisante pour toutes nos expériences. Nous avons préparé une solution-mère (solution aqueuse à 1 %) en ajoutant simplement le colorant à l'eau bidistillée et en agitant vigoureusement. Un contact de plusieurs heures est nécessaire avant l'emploi.

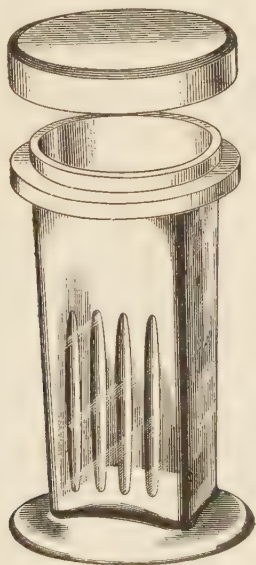
Aucun « mordant » n'a été ajouté.

Cette solution, de longue conversation, n'a pu être utilisée dans nos recherches par suite de la surcoloration intense obtenue qui a pour résultat de grandes irrégularités dans la décoloration. Nos premières recherches en effet furent faites en nous inspirant de la technique de BURKE (1922) : faire agir pendant 3 minutes du violet de gentiane à 1 % en solution aqueuse en ajoutant sur la lame quelques gouttes de solution de bicarbonate de sodium à 5 %. Un léger lavage éliminant l'excès de colorant, faire agir pendant 1 minute la solution iodo-iodurée de formule suivante :

Iode	1 gr.
Iodure de potassium ...	2 gr.
Eau distillée	100 cc.

(à conserver en flacon émeri)

Pour cela, faire couler d'abord le réactif pour entraîner l'eau distillée restée sur la lame et le maintenir ensuite au contact de l'étalement pendant le temps fixé. Un léger lavage suivi d'un essorage au papier-filtre et la préparation est mise au contact du décolorant : éther-acétone 1/3 dans une boîte à rainures de forme haute, avec couvercle rodé, de type américain du modèle ci-dessous.



Ces récipients présentent de nombreux avantages : signalons le contact excellent des préparations avec le réactif qui travaille d'une façon identique pour toutes les lames, l'absence d'évaporation et d'une hydratation possible qui ôterait toute valeur aux résultats. Une étanchéité absolue peut être, en effet, réalisée en vaselinant le couvercle de verre sur le flacon.

Le décolorant est maintenu à la température du laboratoire, soit 18°, et, au cours de son action, on retourne fréquemment les lames de verre en agitant le bain pour régulariser l'opération.

5° APPRÉCIATION DE LA DÉCOLORATION.

Nous avons vu, lors de l'étude des modifications apportées à la technique primitive de GRAM qu'il était nécessaire de ne pas utiliser de contre-colorant dans des recherches théoriques, de grosses causes d'erreur pouvant fausser les résultats.

Dans ces conditions, il faut apprécier la décoloration des cellules après leur contact plus ou moins prolongé avec le réactif de différenciation. Le temps de contact est facilement mesurable si on prend soin de mettre au point une technique de coloration et de décoloration telle qu'il puisse se mesurer en heures. Il servira alors, avec le pourcentage de cellules décolorées, à établir la courbe de décoloration de cellules données.

Le test de décoloration de LASSEUR et SCHMITT, qui comptent comme gram-négatives les cellules de teinte gris-violacée un peu inférieure à la teinte 503 A du CODE DES COULEURS de KLINCKSIECK et VALETTE nous a paru le plus rationnel et nous l'avons adopté dans nos expériences.

L'appréciation de faibles différences de teintes impose de multiples précautions, la plupart signalées dans la littérature et que nous résumons ci-dessous :

Faire toutes les numérations avec le même microscope, la même source de lumière et le même œil.

Nous avons, pour notre part, fait cette étude en utilisant un microscope STRASSNIE muni d'un condensateur ABBE de

STIASSNIE, d'un objectif à immersion de $1/15^e$ STIASSNIE et d'un oculaire n° 3 STIASSNIE. Une platine à déplacement rectangulaire et l'emploi d'un oculaire pourvu d'un réseau permettait l'examen systématique des étalements et rendait les numérations plus faciles. Le microscope, placé dans une chambre noire, était éclairé par une source de lumière aussi constante que possible : lampe électrique dépolie de 50 watts dont l'intensité lumineuse était réglable à l'aide d'un rhéostat.

6° MODIFICATIONS SUCCESSIVES APPORTÉES AUX DIVERS TEMPS DE LA RÉACTION.

Nous avons vu, page 65, que la technique de BURKE, qui garde sa valeur quand on a affaire à de mauvais colorants, ne convenait pas du tout à nos recherches. Le temps de décoloration extrêmement long (plus de 17 jours) n'était pas compatible avec les nombreuses expériences nécessaires. A cette concentration, en effet, le complexe colorant se précipite dans les cellules en masses amorphes, agglomérées, et l'action du décolorant se trouve très ralentie. D'autre part, le bicarbonate de sodium précipite le colorant en intensifiant son action et ne se prête pas à une détermination rigoureuse de la durée de la coloration. Or, pour obtenir des résultats comparables, tout le matériel d'études doit être traité d'une façon identique par les différents réactifs et on sait que la concentration et le temps d'action, pour un même colorant, influent sur la capacité de coloration d'une cellule.

Nous avons supprimé, en conséquence, le bicarbonate de sodium de nos expériences ultérieures.

Une coloration identique à la précédente, sans l'addition de bicarbonate de sodium, nous montra que la surcoloration était trop intense encore. La solution colorante étant donc trop concentrée, nous avons essayé de la faire agir moins longtemps (30 secondes au lieu de trois minutes) en diminuant aussi le temps d'action de la solution iodo-iodurée (20 secondes au lieu de une minute). L'expérience arrêtée au bout de cinq jours de contact avec le même décolorant que précédemment (éther-

acétone 1/3) montra que, dans ces conditions encore, la décoloration était trop lente. Les temps d'action des divers réactifs (30 secondes pour le violet et 20 secondes pour la solution iodo-iodurée) ne pouvaient pas être diminués davantage sous peine de causes d'erreurs importantes assez difficiles à éviter. La détermination du temps de contact des préparations avec les réactifs se trouve en effet toujours entachée de deux erreurs au moins :

1°) erreur dans la lecture de l'heure en introduisant la lame dans le colorant.

2°) Erreur au moment de retirer la lame et qui dépend de la rapidité du léger lavage ultérieur.

Ces erreurs relatives sont les mêmes quel que soit le temps de contact mais croissent en valeur absolue à mesure qu'on le diminue. On peut les négliger à condition de diminuer autant que possible leur valeur absolue. On y arrive ainsi :

a) toutes les colorations sont faites par le même expérimenteur dans les mêmes conditions;

b) ne pas trop diminuer le temps de contact des réactifs.

C'est pourquoi toutes les expériences suivantes furent instituées en fixant à 30 secondes le temps de contact du colorant et à 20 secondes le temps de contact de la solution iodo-iodurée.

On essaya successivement des solutions de violet de gentiane à 1/200^e, 1/400^e, 1/1000^e, le décolorant étant toujours l'éther-acétone agissant à la température du laboratoire (18°). La décoloration était toujours trop longue à obtenir.

On essaya, dans les mêmes conditions, une dilution du colorant à 1/5000^e. L'expérience arrêtée après 112 heures de contact avec le décolorant montra que la moitié des cellules n'était pas encore décolorée.

Il était impossible de diluer indéfiniment le titre du colorant, d'énormes causes d'erreurs pouvant entrer en jeu. La dilution au 1/5000^e nous paraissant elle-même trop élevée, nous avons alors décidé de fixer à 1/1000^e le titre de la solution colorante et de faire varier les autres facteurs.

Facteurs fixés :

Titre de la solution colorante	1/1000 ^e
Temps de contact	30"
Titre de la solution iodo-iodurée	1-2-100
Temps de contact	20"

On ne pouvait plus agir alors que sur le réactif de différenciation.

ESSAIS DE DIVERS DÉCOLORANTS.

La vitesse de décoloration augmentant, pour un même différenciateurs, avec la température et sa concentration en eau, (jusqu'à un certain titre). (Travaux de FLÜGGE, en 1896, de GÜNTHER en 1898, de GRIMME en 1902, de NEIDE en 1903-04, etc...) nous avons fait varier ces facteurs :

a) *Ether-acétone 1/3 en élevant la température.*

Un premier essai fut effectué avec l'éther-acétone agissant à 37°. La décoloration fut obtenue en 8 jours, comme le montre le tableau ci-dessous :

Temps de contact des préparations avec le décolorant :	Pourcentage des cellules décolorées :
26 h. 30	11,10 %
49 h. 45	20,42 %
98 h.	36,30 %
124 h.	82,34 %
8 jours	99 %

Le temps nécessaire pour obtenir la décoloration était toujours inconciliable avec nos expériences et, d'autre part, la température de 37°, facile à obtenir au laboratoire, ne pouvait être augmentée sans cause d'erreurs. Force nous fut alors d'essayer de nouveaux décolorants.

b) *Alcool-acétone.*

1) Le décolorant utilisé d'abord était de formule suivante :

Alcool à 96°7	3 parties
Acétone	1 partie

A la température du laboratoire, 80 % des cellules de la

Levure étudiée étaient décolorées en 66 heures. Ce résultat, insuffisant encore, faisait entrevoir la solution.

2) De nouveaux essais furent entrepris par le même réactif décolorant, mais étendu d'eau :

Alcool à 80°	3 parties
Acétone	1 partie

Un essai entrepris en le faisant agir à 24° montre qu'on obtenait la décoloration en 24 heures. Enfin, à 37°, la décoloration était obtenue en 9 heures.

Ce temps convenait particulièrement à nos recherches car la décoloration n'est pas extrêmement rapide, ce qui permet d'en saisir tous les degrés et n'est pas trop lente, ce qui concilie avec les exigences d'expériences nombreuses.

Une vérification rapide de l'influence du titre du colorant, du temps de coloration, et de la température du décolorant fut faite ainsi :

Deux préparations colorées par la méthode de Gram en utilisant le violet de gentiane au 1/1000^e agissant pendant soixante seconde furent décolorées en :

20 heures par le décolorant agissant à 24°.

18 h. 30 par le décolorant agissant à 37°.

Deux préparations identiques, mais colorées pendant trente secondes par le violet de gentiane au 1/400^e furent décolorées en 24 h. par le décolorant agissant à 37°.

Un tableau résume page 71 les stades successifs de nos expériences préliminaires et les résultats obtenus.

Un autre résultat intéressant pour l'établissement de notre technique d'expérimentation définitive ressortait, en outre, de ces différents essais : la nécessité, pour obtenir des résultats comparables et aussi précis que possible, de pratiquer un grand nombre de numérations pour chaque temps successif. Les pourcentages n'ont en effet de valeur qu'autant qu'ils portent sur un très grand nombre de cellules. Au début de nos expériences, nous fûmes souvent arrêtés par la décoloration parfois irrégulière d'un même étalement. D'autre part, la décoloration des cellules de *Levure* n'est ni régulière ni homogène.

Dilution du violet de gentiane à :	Temps de contact du colorant :	Temps de contact de la solution iodo-iodurée	Nature du décolorant	Température du décolorant	Temps de décoloration
1 p. 100	3 minutes (+Co ³ NaH)	1 minute	éther-acétone (1/3)	18°	plus de 17 jours
1 p. 100	30 secondes	20 secondes	»	»	plus de 5 jours
1 p. 200	»	»	»	»	»
1 p. 400	»	»	»	»	»
1 p. 1000	»	»	»	»	»
1 p. 5000	»	»	»	»	plus de 4 jours
1 p. 1000	»	»	»	37°	8 jours
1 p. 1000	»	»	alcool 96 acétone (3/1)	18°	plus de 3 jours
1 p. 1000	»	»	alcool 80° acétone (3/1)	24°	24 heures
1 p. 1000	»	»	»	37°	9 heures
1 p. 1000	60 secondes	»	»	24°	20 heures
»	»	»	»	37°	18 h. 30
1 p. 400	30 secondes	»	»	»	24 heures

On n'a pas affaire à une tache de couleur qui se décolore progressivement et régulièrement.

Une expérience prouve d'ailleurs que la cellule de *Levure* n'est pas colorée uniformément par le complexe de GRAM :

On traite un étalement fixé par l'alcool-éther pendant 30 secondes par une solution de violet de gentiane de GRÜBLER au 1/5000° pendant 30'', on lave légèrement et on fait agir la solution iodo-iodurée (1-2-100) pendant 20 secondes; on lave, on sèche, on examine au microscope à ce stade. Le faible titre du colorant évite toute surcoloration et réalise une coloration élective. On observe que les cellules ne sont pas colorées uniformément, mais que le complexe est réparti à l'intérieur en granulations plus ou moins grosses.

La décoloration consiste en quelque sorte en une inversion du phénomène.

7°) TECHNIQUE DÉFINITIVE D'EXPÉRIMENTATION

Partir d'une culture de *Saccharomyces Pastorianus* de 48 heures sur carottes, à l'étuve à 24°. Râcler la culture à l'aide d'une anse de platine, sans entraîner le substratum nutritif et l'émulsionner dans de l'eau bi-distillée contenue dans un tube à centrifuger. Laver l'émulsion à plusieurs reprises avec de l'eau bidistillée par centrifugations successives. Essorer. Fixer en bloc pendant 30 secondes avec un petit volume du fixateur choisi en dissociant le culot et en agitant. Faire cesser l'action du fixateur par dilution avec de l'eau bidistillée jusqu'à rétablissement de l'équilibre primitif du tube à centrifuger. Laver à plusieurs reprises avec de l'eau bidistillée par centrifugations successives. Le culot est alors étalé sur lames de verre dégraissées. On pratique 2 étalements par lame.

Coloration :

- a) violet de gentiane GRÜBLER, solution aqueuse à 1/1000^e préparée extemporanément par dilution d'une solution-mère, aqueuse, sans mordant, à 1 % et filtrée .. 30 secondes
- b) laver légèrement;
- c) solution iodo-iodurée (1-2-100) 20 secondes
- d) laver légèrement;
- e) essorer à l'aide de papier filtre, mais en évitant la dessiccation de la préparation;
- f) faire agir, pendant un temps déterminé, le réactif décolorant (alcool à 80°, acétone 3/1) maintenu à l'étuve à 37° dans un flacon de verre à rainures, type américain, bouché-émeri, et luté à la vaseline pour éviter l'évaporation. Retourner fréquemment les lames en les agitant dans le mélange.

Les lames sont retirées successivement du décolorant, aux intervalles de temps choisis et on pratique les numérations en s'entourant des précautions indiquées plus haut et en adoptant, pour test de décoloration, le test de LASSEUR et SCHMITT

c'est-à-dire en comptant comme gram-négatives les cellules de teinte gris violacé, égale ou plus pâle que la teinte 503 A du CODE DES COULEURS.

La moyenne des résultats obtenus donne, par temps, le pourcentage de cellules décolorées. On l'inscrit sur un tableau et on trace la courbe représentant la décoloration en fonction du temps, ainsi que nous l'avons établi plus haut.

Nous insistons sur le fait que des résultats comparables ne peuvent être obtenus qu'en opérant sur un matériel toujours identique. Il faut que la méthode de coloration, fixée ci-dessus en ses moindres détails, soit suivie exactement dans chaque manipulation. Toutes les précautions reconnues nécessaires devront entourer chacun des temps. De nombreux essais ont montré l'influence de chaque facteur, influence qui n'est jamais négligeable et souvent importante.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA DECOLORATION PROGRESSIVE DE CELLULES DE LEVURE COLOREES PAR LA METHODE DE GRAM

La décoloration de cellules gram-positives sous l'action d'un réactif décolorant agissant pendant un temps prolongé ne se produit pas instantanément. Elle est progressive et on obtient des teintes de plus en plus pâles parmi lesquelles il convient de choisir celle que l'on prendra arbitrairement pour terme de la réaction.

Nous avons indiqué plus haut (page 24) le test proposé par NEIDE et celui proposé par LASSEUR. NEIDE, d'autre part,¹, avait remarqué la difficulté d'exprimer la durée de décoloration de chaque espèce microbienne par un chiffre bien défini. Il dut se contenter de fixer entre quelles limites ce chiffre variait et cette détermination exigeait de nombreuses numérations, tant on rencontrait de variations individuelles. Les diverses cellules d'une même préparation se comportent donc d'une manière très variable et l'on trouve constamment à côté d'éléments complètement décolorés, d'autres cellules qui ont conservé leur teinte initiale. Ce fait introduit dans l'appréciation des résultats un facteur d'imprécision sur lequel les Auteurs ne nous paraissent pas avoir suffisamment insisté. Ils nous a semblé que son étude analytique pouvait nous apporter des notions intéressantes, d'autant plus qu'elle nous permettrait en outre d'observer les temps intermédiaires de la décoloration.

(1) Cf., page 60 et suiv.

MATÉRIEL D'EXPÉRIENCE.

TECHNIQUE DE COLORATION ET DE DÉCOLORATION.

Nous avons utilisé le *Saccharomyces Pastorianus* et nous avons opéré exactement suivant les indications résumées page 72 en fixant à l'alcool-éther (alcool à 96°6-éther, aa PE).

RÉSULTATS.

L'expérience faite en double montre que si déjà au bout de 30 minutes, quelques cellules sont décolorées, la décoloration n'est pratiquement totale qu'à la dixième heure. Entre ces deux moments, le pourcentage des cellules décolorées augmente régulièrement, comme le montre le tableau reproduit page 83.

Il y a donc, entre les divers individus d'une même population, des différences pratiquement infinies, les uns se décolorant très vite, les autres après un temps infiniment long, ce qui semblerait enlever toute valeur à la notion établie par NEIDE. [BACH et DELÉTANG, 1931].

Mais d'autre part, les résultats s'inscrivent très régulièrement sur une courbe en S (temps en abscisses, pourcentage de cellules décolorées en ordonnées) semblable à celles qui traduisent une réaction monomoléculaire¹. Ce sont les constantes de cette courbe (paramètre, inclinaison) qui caractérisent le comportement d'une espèce. Il est enfin légitime de penser que c'est la variation d'un facteur unique, probablement l'âge de la cellule, qui est à la base des différences observées. Nous avons recherché plus loin (page 90) l'influence de ce facteur.

IMAGES SUCCESSIVES OBSERVÉES PENDANT LA DÉCOLORATION RALENTIE DE CELLULES DE SACHAROMYCES PASTORIANUS COLORÉES PAR LA MÉTHODE DE GRAM.

Au cours de nombreux essais pratiqués, nous avons observé les stades suivants dans la décoloration, stades que nous avons

(1) Cette courbe constitue la courbe A, page 87.

retrouvés ensuite au cours des très nombreuses numérations microscopiques de cellules de *Levure* pratiquées pendant la décoloration et nécessitées par notre travail.

Au début, les cellules étant colorées 30 secondes avec la solution de violet de gentiane GRÜBLER à 1/1000^e, il y a légère surcoloration. Nous avons estimé que cette légère surcoloration était la preuve que la coloration était complète et suffisante. Les cellules paraissent uniformément colorées en violet noir avec la source lumineuse utilisée.

La décoloration commençant, on constate la présence de granulations tranchant fortement sur un fond plus clair qui se décolore progressivement. Peu à peu, le fond devient de plus en plus pâle, arrive à la teinte 503 A du CODE DES COULEURS (test de décoloration de LASSEUR que nous avons adopté) mais un grand nombre de granulations encore gram-positives font que l'ensemble est toujours considéré comme gram-positif. De rares cellules sont uniformément colorées ou décolorées. En continuant l'action du différenciateur, il semble que la décoloration, commençant par une petite plage interne, s'étend de plus en plus. La plage gram-négative respecte généralement la zone externe qu'on voit se décolorer ensuite. La décoloration des granulations atteignant les teintes 517, 516, 521 du CODE DES COULEURS, l'apparence granuleuse disparaît et la décoloration, plus homogène, s'accroît. On la considère comme totale lorsqu'on arrive à la teinte 503 A et au-dessous.

Le schéma que nous venons de décrire varie avec le milieu de culture (les granulations sont plus rares si les cellules de levure ont poussé en eau de levure maltosée par exemple), avec le décolorant et sa température. Pour un même réactif, de nombreuses variations individuelles sont à remarquer : parfois beaucoup de cellules semblent plus décolorées dans leur partie interne que dans leur partie externe. Parfois les cellules se décolorent progressivement sans qu'on voie apparaître de granulations; parfois un pôle de la cellule reste gram-positif, fortement, tandis que le reste de la cellule est gram-négatif.

Nous avons recherché dans la bibliographie les travaux

mentionnant l'irrégularité de la « coloration » par le complexe de GRAM : Citons HENRICI qui a montré en 1914 que le cytoplasme de la *Levure* ne prend pas le Gram de façon homogène. Il y a des granulations retenant plus fortement le colorant. Cette apparence avait été notée par MOELLER dès 1892. HENRICI mentionne dans ces figures des glands, des ceintures.

Plus récemment, CHURCHMAN montra en 1927 que le *B. Anthracis*, quand on fait agir le colorant et le mordant très peu de temps et l'alcool longuement, présente de magnifiques aspects : une partie centrale décolorée et, à la périphérie, des vestiges du cortex gram-positif non dissous sous forme de points, de plaques.

CHAPITRE IV.

INFLUENCE DE LA FIXATION SUR LA RESISTANCE A LA DECOLORATION DE CELLULES DE LEVURE COLOREES PAR LA METHODE DE GRAM

1) HISTORIQUE.

Dans la littérature, on relève très peu d'auteurs mentionnant une influence possible de la fixation sur la résistance à la décoloration des bactéries colorées par la méthode de Gram.

En 1891, PALTAUF, en 1896 FLÜGGE, observent que la nature de l'agent de fixation peut augmenter le caractère gram-positif d'une cellule. Ils citent l'acide osmique, l'acide chromique, l'alcool, le liquide de MÜLLER, etc.... NEIDE, en 1903, rappelle ces travaux et note les résultats irréguliers de la fixation à la flamme. Par suite, dira BRUDNY en 1908, « l'agent de fixation... peut modifier suffisamment le protoplasme bactérien pour changer sa colorabilité ».

Plus près de nous, LASSEUR, dans son « ETUDE DE LA RÉACTION DE GRAM », (1927) n'étudie pas cette question et son élève COUDRAY (1929), ne distingue pas entre l'emploi de la chaleur, de l'alcool ou du sublimé et conclut qu'en règle générale, il n'y a aucun inconvénient, dans la pratique, à employer l'alcool, le sublimé, l'acide acétique, le chauffage.

Le cytoplasme cellulaire constitue un système compliqué, essentiellement formé de substances protéiques (parmi lesquelles surtout les nucléoprotides), de lipides, de glucides et de sels. Les protides forment la majeure partie des cellules. On les rencontre sous forme d'holoprotides et d'hétéroprotides (nucléoprotides).

Suivant l'agent fixateur employé, ces divers constituants seront plus ou moins bien conservés.

La fixation a pour but essentiel de tuer la cellule en coagulant ou précipitant ses constituants qui devront être aussi bien conservés que possible. Elle y arrive par des moyens divers et l'état final de la cellule fixée va varier selon le fixateur employé. Or, l'état du cytoplasme, au moment de la coloration par la méthode de GRAM, est très important, quelle que soit la théorie de la réaction que l'on envisage. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher d'une manière précise, quelle pourrait être l'action de la fixation sur la résistance de cellules à la décoloration.

Nous allons tout d'abord, en nous aidant des travaux les plus récents, étudier quelles modifications du cytoplasme amènent les principaux fixateurs et, dans une seconde partie, étudier la résistance à la décoloration de cellules de *Levure* fixées par des moyens différents et colorées par la méthode de GRAM.

Aucun fixateur ne peut arriver à respecter l'intégrité de structure en coagulant ou précipitant les constituants cellulaires (LANGERON). D'après les conceptions modernes, le cytoplasme est un hydrogel, par conséquent une substance microscopiquement homogène, à l'état vivant. Les premiers fixateurs utilisés, empiriquement d'ailleurs, coagulaient trop brutalement la cellule et détruisaient des constituants très importants. d'où ces artefacts de structure qu'ils faisaient apparaître. Ces fixateurs étaient surtout constitués d'oxydants acides tels les acides chromique, picrique, acétique, ou de réducteurs tels l'aldéhyde formique, l'acétone, l'alcool méthylique, l'alcool éthylique. Les travaux de UNNA, cités par LANGERON, montrent que la fixation est le résultat de phénomènes d'oxydation et de réduction plutôt que de combinaisons entre acides et bases.

Les fixateurs oxydants acides sont de mauvais fixateurs du cytoplasme qu'ils détruisent ou transforment en combinaisons sans grande affinité colorante. Les fixateurs réducteurs sont bien préférables pour l'étude du cytoplasme.

Les fixateurs les plus acides, d'autre part, et l'alcool qui

déshydrate trop fortement, coagulent brutalement le cytoplasme et dissolvent les lipides qui sont parmi les constituants essentiels des cytoplasmes (GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL, 1933).

Nous allons passer en revue les divers fixateurs utilisés dans notre étude en insistant ensuite sur les raisons qui ont motivé leur emploi.

2) FIXATEURS UTILISÉS ¹.

1°) **Alcool-éther :**

Alcool à 96°	{	aa P. E.
Ether		

2°) **Le liquide de BOUIN :**

Sol. aq. sat. d'acide picrique	30 cc.
Sol de formol à 40 %	10 cc.
Acide acétique cristallisable	2 cc.

3°) **Le sublimé-acétique :**

Sol. aq. sat. de sublimé corrosif	95 cc.
Acide acétique cristallisable	5 cc.

4°) **Le mélange de ORTH ou MULLER-Formol :**

Bichromate de potassium	2 gr. 50
Sulfate de sodium	1 gr.
Eau distillée	100 cc.
Ajouter extemporanément :	
Formol neutralisé	10 cc.

5°) **Le mélange de CHAMPY :**

Sol aq. de bichromate de potassium à 3 %	7 parties
Sol aq. d'acide chromique à 1 %	7 parties
Sol aq. d'acide osmique à 2 %	4 parties

RAISONS MOTIVANT LEUR EMPLOI.

a) *L'alcool à 96°, associé à l'éther*, fut le fixateur utilisé pour

(1) Les formules de ces réactifs sont extraites du Précis de Microscopie de LANGERON (1925).

nos premières recherches. Il nous a servi, comme nous l'avons vu page 63 à mettre au point notre technique de coloration et de différenciation. C'est un fixateur faiblement réducteur, ne donnant pas aux tissus une grande affinité chromatique. Il ne conserve pas le chondriome car il dissout les lipides auxquels le chondriome doit son affinité chromatique.

b) *L'acide acétique* est à la base d'un grand nombre de mélanges fixateurs. Il gonfle le cytoplasme et précipite les substances nucléaires. *L'acide picrique* est un oxydant qui fixe bien les tissus réducteurs. *Le formol*, est un bon conservateur des lipides neutres.

L'association de ces trois corps forme le picro-formol de BOUIN, fixateur universel, très utilisé en histologie animale, mais qui ne conserve pas le chondriome.

c) *Le bichlorure de mercure*, en solution aqueuse, est un oxydant acide qui précipite les protides et parmi ceux-ci surtout les nucléoprotides. *L'acide acétique* qu'on lui adjoint dans le fixateur « *sublimé-acétique* » rend le réactif plus pénétrant. Le chondriome n'est pas conservé.

L'emploi de nouvelles techniques de fixation, coagulant moins brutalement le protoplasme, conservant mieux tous ses éléments, en particulier les lipides, permet à BENDA, MEVES, REGAUD, FAURE-FREMIET, de découvrir les chondriosomes dans les cellules animales. Ces organites constitutifs du cytoplasme furent trouvés ensuite dans toutes les cellules animales et végétales, sauf dans les bactéries et les *Algues Cyanophycées* où ils ne semblent pas exister. Mais ces organismes ont une structure spéciale, qui les éloignent de tous les autres végétaux (GUILLIERMOND, PLANTEFOL et MANGENOT) (1933). Ces chondriosomes sont constitués, comme le cytoplasme, par un complexe colloïdal, lipoprotidique, avec prédominance de lipides. Les méthodes dites « mitochondriales » respectant les lipides, permettent de les conserver.

d) *Le mélange de ORTH* ou MÜLLER-FORMOL, de composition voisine du fixateur de REGAUD¹ conserve le chondriome.

(1) Voir formule, page 98, note (2).

Il contient du bichromate de potassium qui fixe bien le cytoplasme et du formol neutralisé.

e) *Le Mélange de CHAMPY* fut le dernier fixateur utilisé dans nos recherches. *L'acide osmique*, ou plus exactement le tétraoxyde d'osmium, oxydant très énergique a une action fixatrice différente de celle des sels métalliques. Il ne précipite pas le cytoplasme.

Les cellules de *Levure* utilisées dans nos recherches, contenant, parmi les matières grasses, des lipides à acides gras non saturés, (oléide par exemple) et les combinaisons de ces lipides avec les protides, l'acide osmique se réduit en un précipité noir d'osmium. La cellule se trouve donc parsemée de granulations noirâtres. L'acide osmique constitue le réactif électif de ces lipides.

L'acide chromique, associé dans la formule de CHAMPY, à l'acide osmique, complète heureusement la fixation par son action sur le cytoplasme, car l'acide osmique rendrait ce dernier difficilement colorable.

Le fixateur de CHAMPY, par cette double action sur le cytoplasme et ses inclusions graisseuses, nous a donc paru un fixateur particulièrement adapté à l'étude de la réaction de GRAM, beaucoup d'auteurs, ainsi que nous l'avons vu dans notre étude bibliographique, attribuant en effet la réaction de GRAM à certains lipides (lipides à acides gras à liaisons éthyléniques).

3) TECHNIQUE D'EXPÉRIMENTATION.

Matériel d'expérience.

Technique de coloration et de décoloration.

Nous avons utilisé le *Saccharomyces Pastorianus* et nous avons opéré exactement suivant les indications résumées page 72 en fixant au moyen des divers réactifs énumérés ci-dessus pendant 30 secondes.

4) RÉSULTATS.

Nous exposons ci-après les résultats obtenus concernant chaque fixateur utilisé.

**ALLURE DE LA DÉCOLORATION DE CELLULES DE LEVURE
DE 48 HEURES COLORÉES PAR LA MÉTHODE DE GRAM
DANS LES CONDITIONS PRÉCÉDEMMENT DÉCRITES.**

1) AGENT FIXATEUR : ALCOOL-ÉTHÉR.

Temps de contact	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
0 h. 30	4454	30	0,66 %
1 h.	4505	59	1,29
1 h. 30	5257	257	4,80
2 h.	7852	333	4,06
2 h. 30	9004	370	3,94
3 h.	8490	530	5,87
3 h. 30	4231	355	7,74
4 h.	5734	1006	14,92
4 h. 30	3100	971	23,85
5 h.	2570	1480	36,54
5 h. 30	2326	1823	43,93
6 h.	1690	2735	61,80
6 h. 37	884	3477	79,72
7 h.	708	4118	85,53
8 h.	194	4037	95,19
8 h. 30	133	4011	96,80
9 h.	111	5250	97,93
9 h. 30	56	4210	98,68

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique A, page 87).

2) AGENT FIXATEUR : LIQUIDE DE BOUIN.

1 h.	4500	85	1,85 %
2 h.	4227	154	3,51
2 h. 30	4290	271	5,94
3 h.	4062	334	7,50
4 h.	4045	542	11,81
4 h. 30	3815	597	13,51
5 h.	3810	662	14,80

Temps de contact	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
5 h. 30	3390	846	19,97
6 h.	2683	1554	36,67
6 h. 30	1392	2600	65,13
7 h.	961	3084	76,24
7 h. 30	785	3723	82,58
8 h.	591	3435	85,32
8 h. 30	488	3778	88,51
9 h.	392	3962	91,11
9 h. 30	272	4090	93,76
10 h. 30	89	4036	97,84
11 h.	40	3943	99
11 h. 30.			99,9

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique B, page 87).

3) AGENT FIXATEUR : SUBLIMÉ-ACÉTIQUE.

1 h.	4010	105	2,55 %
2 h.	3942	167	4,06
2 h. 30	4202	223	5,03
3 h.	4062	245	5,68
4 h.	3862	284	6,84
4 h. 30	3798	298	7,20
5 h.	3901	342	8,06
5 h. 30	3663	337	8,42
6 h.	3723	393	9,70
7 h.	3060	402	11,61
8 h.	2890	380	12,75
8 h. 30	2050	310	13,5
9 h.	3535	624	15,00
9 h. 30	3387	607	15,20
10 h. 30	537	3418	86,42
11 h.	533	3496	86,76
12 h.	345	3442	90,95
13 h.	252	3918	94,05

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique C, page 87).

4) AGENT FIXATEUR : MÜLLER-FORMOL.

Temps de contact	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
1 h.	4012	83	2,02 %
2 h.	4136	185	4,28
2 h. 30	3835	172	4,29
3 h. 30	2755	381	8,24
5 h.	3155	340	9,71
7 h.	3544	473	11,77
9 h.	3236	529	14,05
10 h.	3590	529	14,00
11 h.	3425	648	16,31
11 h. 40	1549	1886	54,9
12 h.	432	3500	89,00
12 h. 30	394	3576	90,00
15 h. 30	209	3181	93,55
16 h. 30	74	3960	98,16

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique D, page 87).

5) AGENT FIXATEUR : FIXATEUR DE CHAMPY.

2 h. 30	4124	126	2,96 %
4 h.	4030	144	3,45
8 h.	4054	246	5,72
12 h.	3943	281	6,65
16 h.	3931	373	8,44
20 h.	3704	533	12,57
22 h.	3460	509	12,82
24 h.	3545	709	16,66
26 h.	3289	849	20,50
27 h.	2929	1177	28,66
28 h.	2557	1863	43,94
29 h.	1550	2578	62,45
30 h. 10	877	3131	78,25
31 h.	713	3350	82,51

Temps de contact	Cellules Gram +	Cellules Gram -	Pourcentage de cellules décolorées
32 h.	542	3478	86,56
33 h.	105	900	90,00
35 h.	102	1980	95,10
39 h.	158	3970	96,17

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique E, page 87).

Si l'on représente graphiquement les résultats obtenus en inscrivant les temps en abscisses et les pourcentages des cellules décolorées en ordonnées, on obtient des courbes en S reproduites page 87 et définies par leur inclinaison et leur paramètre.

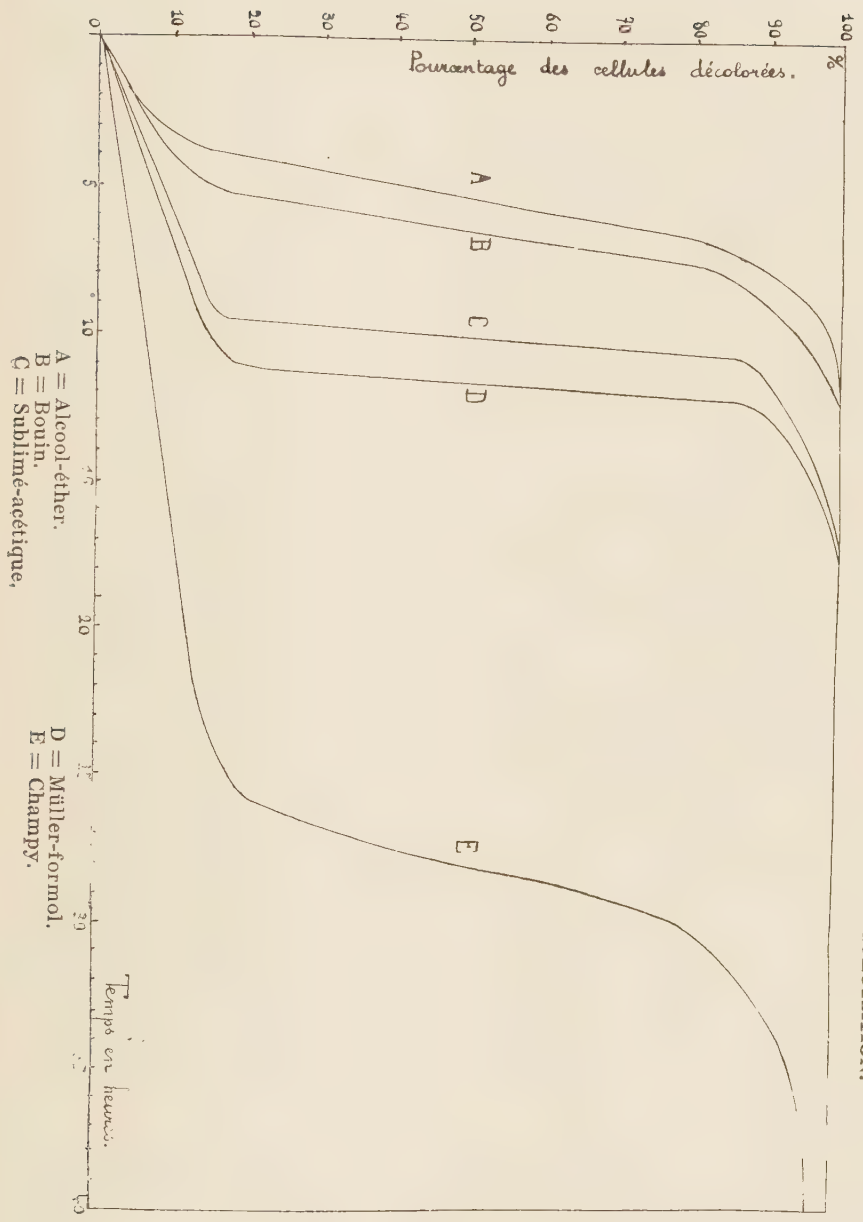
5) CONCLUSION.

En examinant les graphiques correspondant à la décoloration de cellules de *Levure* provenant d'une culture de 48 heures et fixées par des moyens différents, on observe de grandes variations dans la vitesse de décoloration.

Avec l'**alcool-éther**, la décoloration commence rapidement et est pratiquement totale vers la *neuvième heure*. Les cellules fixées au **Bouin**, au **Müller-Formol** et au **sublimé acétique** ont une résistance comparable (11 à 15 h. environ) qui contraste vivement avec celle offerte par les préparations fixées au **Champy** (40 heures environ). Or, il faut remarquer que ce dernier réactif est un fixateur type du chondriome, alors que les précédents, réducteurs ou acides, ont pour caractère commun d'être de mauvais agents de conservation du chondriome.

Le chondriome, en effet, dont la présence est universelle dans la cellule, semble constitué au point de vue chimique, ainsi que nous l'avons vu, par une combinaison de protides et de lipides, dans laquelle les lipides dominent. Il est profondément altéré par les fixateurs à base d'acide acétique ou d'alcool qui dissolvent les lipides. Les fixateurs **chromo-osmiques** ou les mélanges **formol-bichromate de potassium** conservent le chondriome, surtout en faisant suivre leur action d'un post-chromisation.

ACTION DE DIVERS FIXATEURS SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.



Le MÜLLER-FORMOL, de composition voisine du fixateur de REGAUD, formule IV, et qui pour cette raison doit être un bon conservateur du chondriome, double la résistance de la cellule à l'action décolorante de l'alcool acétone, celle consécutive à l'emploi de l'alcool-éther étant prise comme type.

Cependant il s'éloigne sensiblement du CHAMPY qui rend la cellule 4 à 5 fois plus résistante à l'action du même réactif. En ce qui concerne ce dernier réactif, il faut envisager aussi l'action de l'acide osmique sur les lipides non saturés. D'autre part, de ces deux derniers réactifs qui sont de bons conservateurs du chondriome et qui agissent très différemment sur la résistance à la décoloration des cellules de *Levure*, il faut remarquer que le premier a été employé sans post-chromisation.

En résumé, l'examen des temps de décoloration variant considérablement avec le fixateur employé montre *l'importance de la fixation dans la réaction de GRAM*, puisque des cellules identiques, suivant l'emploi de tel ou tel fixateur, toutes choses égales d'ailleurs, se trouvent 4 à 5 fois plus résistantes à l'action de l'agent de décoloration.

Il convient également de remarquer que les *fixateurs types du chondriome sont les meilleurs agents de fixation*, en ce qui concerne la résistance à la décoloration de cellules gram-positives.

De plus, la représentation sur un même graphique des courbes de décoloration des cinq fixateurs étudiés montre que les tracés sont sensiblement parallèles. Ces courbes, en S, ont la même forme générale, la même inclinaison. Seul le paramètre diffère. Elles sont simplement décalées les unes par rapport aux autres. Pour atteindre le seuil de décoloration, il faut un temps d'action variable avec le fixateur. Ce seuil de décoloration une fois atteint, la décoloration se poursuit suivant le même rythme. (DELÉTANG, 1932).

Cette forme-type de courbe montre de plus ainsi que nous l'avons remarqué page 75, que les divers individus d'une même population se décolorent en des temps très variables, puisque, dans le cas de l'alcool-éther par exemple, si quelques cellules

sont déjà décolorées en 30 minutes, la décoloration n'est pratiquement totale qu'à la 10^e heure.

Nous avons signalé page 75 que cette courbe en S est semblable à celles qui traduisent une réaction monomoléculaire et nous avons estimé avec BACH, que c'était la variation d'un facteur unique, l'âge probablement, qui était à la base des différences observées.

En effet, la technique d'expérimentation étant définie exactement dans ses moindres détails, les variations observées dans la décoloration d'une même population ne peuvent être attribuées qu'à des variations individuelles. Le fait de trouver des courbes de décoloration parallèles, et simplement décalées les unes par rapport aux autres en partant d'une même culture fixée par divers réactifs, renforce encore cette opinion.

Or, la culture de *Saccharomyces Pastorianus* utilisée, âgée de 48 heures, contient évidemment des cellules d'âge différent, variant de 0 à 48 heures. Les cellules une fois récoltées étant traitées d'une façon absolument identique, il nous paraît légitime de penser qu'aux différents points de la courbe correspondent des cellules d'âge différent.

C'est pourquoi nous avons estimé qu'il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en recherchant l'influence possible de l'âge des cellules sur leur résistance à la décoloration, dans la méthode de GRAM.

C'est là l'objet du chapitre suivant de ce travail.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE L'ÂGE DES CELLULES SUR LEUR RESISTANCE A LA DECOLORATION, DANS LA METHODE DE GRAM

Cette étude, ainsi que nous venons de le voir, s'impose pour essayer d'expliquer la forme de la courbe en S obtenue précédemment. Elle nous a paru utile également en raison de la divergence des résultats des travaux publiés jusqu'ici, travaux que nous avons résumés dans la partie bibliographique de ce travail (page 26 et s.). Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'appliquer à cette étude la méthode de décoloration ralentie déjà employée pour l'étude des fixateurs et portant sur un temps s'exprimant en heures et non en minutes, ce qui diminue beaucoup les erreurs absolues des expériences.

Nous avons opéré, dans une première partie sur la levure : *Sac. Pastorianus* que nous avons utilisée précédemment et, dans une seconde partie, sur deux bactéries : la *Bactéridie Charbonneuse* et le *B. Mesentericus Nuber*.

I. ETUDE DE LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION DE CELLULES DE SAC. PASTORIANUS D'ÂGE DIFFÉRENT.

A) Technique d'expérimentation.

Pour étudier l'influence de l'âge des cellules sur leur résistance à la décoloration, il nous fallait commencer avec des éléments aussi jeunes que possible. Cela nous a conduit à abandonner le milieu utilisé dans nos recherches précédentes (carotte) car l'enduit n'étant bien formé qu'au bout de 24 heures environ, il était impossible de prélever suffisamment de cellules,

avant ce temps, sans entraîner de substratum nutritif. Un milieu liquide devient alors préférable car une simple centrifugation sépare au moment opportun la levure de son milieu de culture.

Nous avons choisi l'eau de levure maltosée préparée ainsi : « faire bouillir 5 minutes de la levure de boulanger fraîche avec 10 fois son poids d'eau. Additionner de 3 % de maltose. Filtrer sur Chardin mouillé. Répartir en tubes à raison de 10 cc. par tube et stériliser 15 minutes à 120°. »

Après quelques réensemencements sur ce milieu maintenu à l'étuve à 24°, le *Sac. Pastorianus* présente déjà un dépôt suffisant au bout de 8 heures avec début de fermentation du maltose. Le dépôt est abondant dès 16 heures.

Nous avons suivi pour ces recherches la même technique que précédemment (voir page 72). Pour cela, nous avons préparé des cultures de *Sac. Pastorianus* de 8 heures, 24 heures, 48 heures, 6 jours, 15 jours et, ayant au laboratoire une culture datant de 10 mois $\frac{1}{2}$, nous l'avons également étudiée.

Une centrifugation peu rapide sépare au moment choisi les cellules de levure de leur milieu de culture. On lave à 3 ou 4 reprises avec de l'eau distillée et filtrée pour éliminer les impuretés provenant du milieu. Le culot obtenu est fixé en bloc par le fixateur choisi en 30 secondes. On emploie naturellement pour les cellules d'âge différent, le même réactif fixateur. Nous avons choisi l'alcool-éther. On lave ensuite à 6 ou 7 reprises pour éliminer toute trace du fixateur. On étale avec les précautions indiquées précédemment. Les graphiques résumant les résultats seront construits comme précédemment. Des lames d'essai faites pour chaque série permettent de deviner l'allure de la décoloration et de préciser surtout les points importants.

B) Résultats.

Nous exposons ci-après les résultats obtenus concernant des cultures de *Levure* d'âge croissant.

ALLURE DE LA DÉCOLORATION DE CELLULES DE LEVURE
D'AGE CROISSANT.

1) Culture de huit heures.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
1 heure.	3.571	60	1,6 %
5 heures	2913	168	5,45
7 heures.	2903	224	7,16
10 heures.	1211	194	13,80
14 heures.	426	138	24,47
15 heures.	519	179	25,61
18 heures.	2346	1102	31,96
21 heures.	2060	1372	39,97
24 heures 30.	1554	1264	44,85
27 heures 30.	615	948	60,65
28 heures 30.	516	1520	74,65
30 heures.	321	2140	86,00

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique F, page 96).

2) Culture de 24 heures.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
1 heure.	1006	30	2,80 %
8 heures.	587	57	8,87
15 heures.	1209	352	23,08
19 heures.	1015	428	29,65
21 heures.	554	593	50,84
22 heures.	406	1019	71,50
24 heures.	227	1045	82,15
25 heures.	232	2401	91,18

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique G, page 96).

3) Culture de 48 heures.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
1 heure.	1556	244	13,55 %
2 heures 30.	1935	442	18,60
4 heures.	1402	704	33,42
8 heures.	850	1612	65,47
10 heures.	432	2100	83,30
12 heures.	135	1045	88,47
15 heures.	60	950	94,05
17 heures 20.			99,00

(Les résultats s'inscrivent sur le graphique H, page 96).

4) Culture de 6 jours.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
0 heure ¹ .	500	3	0,6 %
1 heure.	1385	105	7,04
2 heures.	1204	340	22,07
3 heures.	765	760	50,00
4 heures.	657	1170	64,03
5 heures.	640	1412	74,30
6 heures.	320	1680	84,00
7 heures.	481	2803	85,30
8 heures 20.	252	1575	87,50
10 heures 30.	93	1728	94,80
11 heures 40.	60	1230	95,30

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique I, page 96).

(1). La numération a été faite avant toute action de l'agent de différenciation. Dans ce cas, l'autolyse de 0,6 % des cellules était si poussée que ces éléments n'avaient plus aucune affinité pour le colorant.

5) Culture de 15 jours.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
0 heure ¹ .	1260	57	4,23 %
1 heure.	1226	1200	49,46
2 heures.	864	1302	60,11
3 heures.	701	1706	70,83
4 heures.	294	1911	86,66
6 heures ¹⁰ .	147	1668	91,90
8 heures.	108	2073	95,04

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique J, page 96).

Cas d'une culture de 10 mois $\frac{1}{2}$.

Nous avons d'abord vérifié la vitalité de la souche. Un ensemencement en milieu neuf montre une poussée après quelques jours d'étuve à 24°. La croissance est donc très ralentie, mais quelques repiquages successifs rendent à la levure ses caractères primitifs (notamment la vitesse de croissance).

Une coloration simple au bleu de méthylène montre que la plupart des cellules ne se colore pas (disparition des protides et des nucléoprotides) ou se colore peu. On observe tous les termes de passage, du blanc bleuté 0.446, 428. A, B, C, D, du CODE DES COULEURS au bleu foncé plus ou moins granuleux.

Une coloration par le Gram *non suivie de décoloration* donne des résultats analogues. Elle montre en effet quelques cellules fortement gram-positives, de très nombreuses cellules n'ayant pas pris, ou à peine, la coloration (503 A, B, du Code), beaucoup enfin, sont remplies de granulations gram-positives qui subsistent seules, dessinant par leur position la forme de la cellule, la membrane et le cytoplasme n'étant plus visibles. On remarque de nombreux fragments informes et quelques formes filamenteuses n'ayant pas pris la coloration. On suit donc les

(1) La numération a été faite avant l'action de l'agent de différenciation. Dans ce cas l'autolyse de 4,23 % des cellules était si poussée que ces éléments n'avaient plus d'affinité pour le colorant.

différents stades de l'autolyse suivant les degrés variables de résistance des différents constituants cellulaires aux ferments digestifs.

Nous avons essayé de décolorer ces étalements. Après 2 heures de traitement, on constate que tout est décoloré sauf quelques cellules jeunes.

Nous avons groupé dans le tableau page 96 les tracés obtenus avec les cellules de *Sac. Pastorianus* de 8 heures (courbe F) de 24 heures (courbe G), de 48 heures (courbe H), de 6 jours (courbe I), de 15 jours (courbe J).

C) Conclusion.

En se reportant aux résultats obtenus, on remarque que :

90 % des cellules de *Sac. Pastorianus* de 8 heures sont décolorées en plus de 30 heures.

90 % des cellules de *Sac. Pastorianus* de 24 heures sont décolorées en plus de 25 heures.

90 % des cellules de *Sac. Pastorianus* de 48 heures sont décolorées en moins de 15 heures.

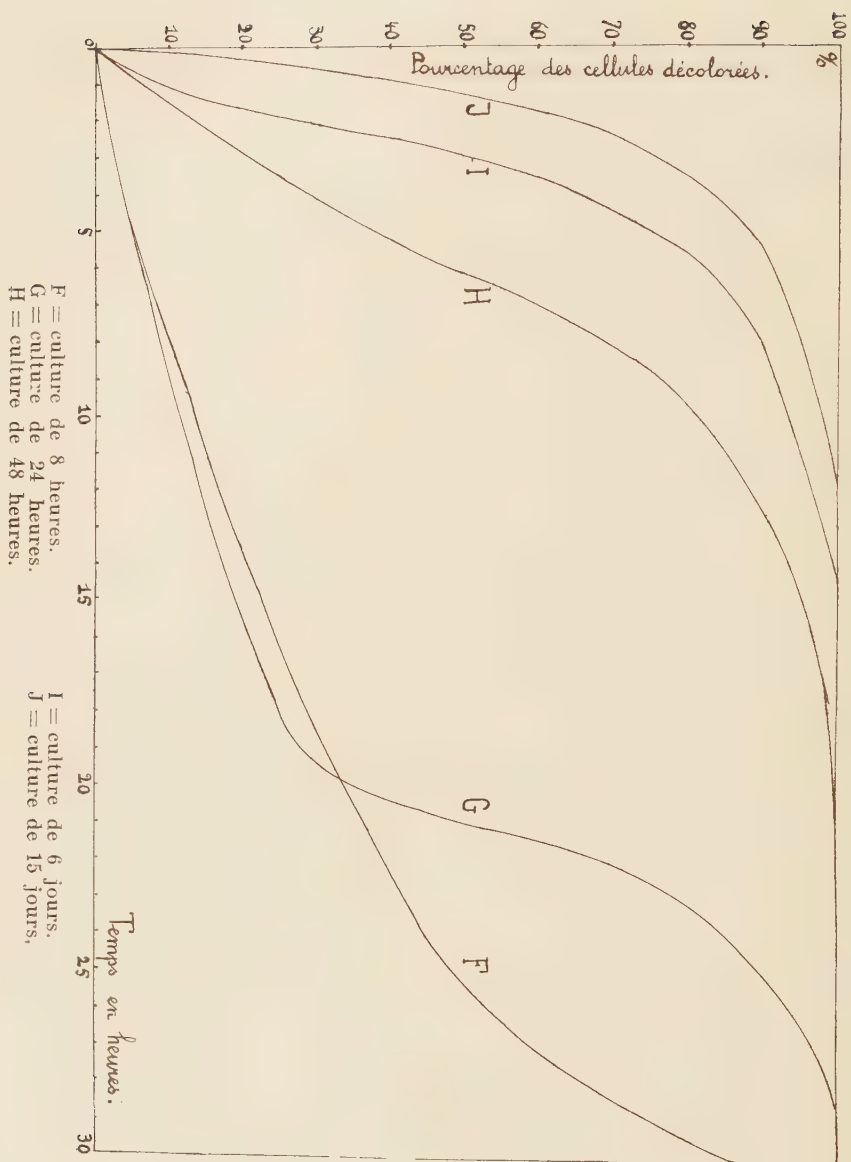
90 % des cellules de *Sac. Pastorianus* de 6 jours sont décolorées en moins de 10 heures.

90 % des cellules de *Sac. Pastorianus* de 15 jours sont décolorées en moins de 6 heures.

Ceci démontre péremptoirement que les cellules de Levure jeunes résistent plus longtemps à la décoloration que les cellules âgées. Notons d'ailleurs que les résultats obtenus avec les cultures de 8, 24 et 48 heures doivent seuls servir à notre conclusion. Il est évident que les cellules vivantes des cultures de 6 et 15 jours sont en réalité beaucoup plus jeunes. Elles se décolorent cependant plus vite que les cellules de 48 heures, probablement par suite de l'appauvrissement et certainement à cause du changement de composition et du pH du milieu de culture.

Les graphiques obtenus ne montrent pas la courbe en S définie précédemment (page 75) lorsqu'on utilise des cellules jeunes provenant d'une culture de 8 heures ou très âgées provenant par exemple d'une culture de 6 ou de 15 jours. La courbe représentant l'allure de la décoloration d'une culture de

INFLUENCE DE L'ÂGE DES CELLULES SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.



24 heures montre déjà un S très étalé. Cet ensemble de faits montre donc qu'il est rationnel de penser que, aux différents paliers de la courbe en S que nous avons définie pour des cellules de 48 heures dans le Chapitre précédent de ce travail, correspondent des cellules d'âge différent. A différence d'âge doit correspondre différence de composition chimique. Les cellules les plus âgées et celles qui ont subi divers stades de dégradation autolytique sont décolorées les premières et leur très rapide décoloration s'inscrira sur la première portion de la courbe. Selon le fixateur utilisé, selon qu'il conservera plus ou moins bien les lipides et certaines combinaisons lipoprotidiques, substances de réserve des cellules adultes, cette première portion sera plus ou moins allongée. Nous avons en effet remarqué précédemment que les différents graphiques correspondant à la décoloration de cellules identiques fixées différemment étaient analogues sauf dans leur première portion plus ou moins allongée. Les cellules les plus jeunes étant au contraire décolorées les dernières inscriront la dernière portion des graphiques. La portion intermédiaire de la courbe, qu'on pourrait assimiler à une droite de forte pente, et qui traduit en tout cas une décoloration brutale car extrêmement rapide, correspond probablement à la grande quantité de cellules de même âge et qu'on considère implicitement quand on parle d'une culture de 24 ou 48 heures, par exemple. Ces cellules étant d'âge très voisin se décolorent presque ensemble et font passer la décoloration de l'ensemble des cellules de 0 à 48 heures de 10 à 80 %, par exemple, en considérant l'allure de la décoloration de cellules de *levure* fixées par l'alcool-éther (page 83).

Quoiqu'il en soit, l'étude de cellules de 8 heures, 24 heures, 48 heures, 6 et 15 jours nous a fait parcourir et au delà le cycle complet de l'évolution de la *levure* puisque, sur des cellules mortes, nous pouvons assister à des phénomènes plus ou moins avancés d'autolyse. Il est en effet légitime de penser que le peu de résistance des cellules de 6 et 15 jours à la différenciation par l'alcool-acétone tient, pour une part tout au moins (car il faut envisager aussi l'épuisement plus ou moins complet du milieu de culture), à la disparition des constituants cellulaires gramophiles.

2) ETUDE DE LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION DE BACTÉRIES D'ÂGE DIFFÉRENT.

Nous avons cherché à retrouver sur des bactéries les résultats obtenus sur des cellules de levure, à savoir que l'âge de la cellule a une influence certaine sur la résistance à la décoloration, dans la méthode de GRAM, et que ce sont les éléments les plus jeunes qui sont les plus résistants.

A) Technique d'expérimentation.

Nous avons donc institué deux séries d'expériences parallèles portant sur :

1° *Bacillus Mesentericus Ruber* (Collection de l'Institut Pasteur).

2° *Bactéridie charbonneuse* ¹.

Ces bactéries furent cultivées à l'étuve à 37° sur de la gélose-bouillon inclinée de formule classique et ajustée à pH = 7,6. Les étalements ont été réalisés en émulsionnant dans une goutte d'eau une petite anse de platine chargée de la culture d'âge convenable et en s'attachant à n'obtenir que des préparations minces, aux éléments bien dispersés. Après dessiccation à la température de la pièce, fixation au liquide de REGAUD (IV) ² pendant une minute, lavages répétés pour éliminer l'excès du réactif et dessiccation, les lames sont colorées suivant notre technique habituelle soit :

Sol. aq. filtrée extemp. de violet GRÜBLER à 1.0/00. 30 sec.

Laver légèrement à l'eau distillée.

Sol. iodo-iodurée (1-2-100) 20 sec.

Laver à l'eau distillée, essorer au papier filtre, plonger dans le différenciateur en notant l'heure.

(1) Cette souche de *Bactéridie Charbonneuse*, provenant de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort nous a été très aimablement donnée par Monsieur M. PIETTRE, Directeur du LABORATOIRE des HALLES CENTRALES de Paris, grâce à l'obligeance de notre camarade P. VILLEDIEU, Docteur en Pharmacie.

(2) Formule du liquide de REGAUD (IV) :

Sol. aq. de bichromate de potassium à 3 %	80 %
Formol Codex neutralisé par CO ³ Ca	20 %

Nous avons utilisé le même réactif différenciateur que précédemment, soit : Alcool à 80° 3 parties

Acétone 1 partie

mais, à la température du laboratoire, la décoloration était si brutale (quelques minutes) que d'énormes causes d'erreurs intervenaient. Nous avons ralenti l'action du réactif en opérant en glace fondante. (La vitesse de décoloration, en effet, croît avec la température : FLÜGGE, GÜNTHER, GRIMME, BRUDNY, NEIDE, LASSEUR, etc.).

B) Résultats.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1^o) Culture de Bactéridie charbonneuse de 4 heures 30.

Temps d'action du décolorant :

- 0 heure : Bacilles très colorés en violet noir, rarement sporulés.
- 1 heure : Bacilles très colorés. De rares bactéries sont décolorées.
- 1 heure 30 : Bacilles bien gram-positifs. Pas de granulations.
- 1 heure 45 : L'ensemble se décolore. La moitié des bactéries est gram-négative.
- 2 heures : La décoloration s'accroît mais il persiste quelques bactéries gram-positives.
- 2 heures 15 : La décoloration est à peu près complète.

Culture de Bactéridie charbonneuse de 15 heures.

- 0 heure 30 : Ensemble très coloré, sauf le centre des bact. qui se décolore¹. Pas de granulations.
- 1 heure 30 : Bactéries assez décolorées, bien gram-positives cependant. Pas de granulations.
- 2 heures : Décoloration complète.

Culture de Bactéridie charbonneuse de 24 heures.

- 0 h. 30 : Ensemble très coloré. Présence de granulations gram-positives et fond gram-positif.
- 1 h. : Ensemble assez coloré, granulation et fond gram-positifs.

(1) Nous retrouvons le résultat de CHURCHMAN (6) qui s'exprime ainsi : Le *B. Anthracis*, quand on fait agir le colorant et le mordant très peu de temps, présente de magnifiques aspects : une partie centrale décolorée et à la périphérie, des vestiges du « Cortex » gram-positif.

- 1 h. 45 : Ensemble peu coloré, gram-positif cependant.
2 h. : Ensemble décoloré.

Culture de Bactéridie charbonneuse de 48 heures.

- 0 h. 30 : Ensemble très coloré, granulations et fond gram-positifs.
0 h. 50 : Fond presque décoloré, les granulations se décolorent.
1 h. : Fond décoloré. Quelques granulations gram-positives persistent.

Culture de Bactéridie charbonneuse de 7 jours.

- 0 h. 15 : La plupart des bactéries sont faiblement gram-positives. Peu de granulations.
0 h. 30 : Fond à peu près décoloré. Peu de granulations gram-positives.
0 h. 45 : Décoloration complète.

2°) Culture de *Bacillus mesentericus ruber* de 24 heures.

Temps d'action du décolorant :

- 0 heure : Toutes les bactéries sont uniformément colorées en violet noir.
0 h. 15 : Légère décoloration du fond sur lequel tranchent des granulations fortement gram-positives.
0 h. 30 : Fond presque gram-négatif. Les granulations gram-positives persistent.
0 h. 50 : Fond décoloré. Les granulations gram-positives persistent.
1 h. 30 : Fond décoloré. Les granulations gram-positives persistent.
3 heures : Fond décoloré. Les granulations gram-positives persistent.
3 h. 30 : Les granulations deviennent pâles.
4 h. 30 : Il ne persiste plus que de rares granulations gram-positives.
5 heures : Décoloration totale.

Note : La décoloration est totale en cinq minutes si le réactif décolorant agit à 37°.

Culture de *Bacillus mesentericus ruber* de 48 heures

0 h. 15 : Le fond se décolore.

0 h. 45 : Fond gram-négatif. Granulations gram-positives.

1 heure : — — —

1 h. 30 : — — —

2 heures : Décoloration quasi complète.

Culture de *Bacillus mesentericus ruber* de 7 jours.

0 heure : Beaucoup de bacilles sont à peine gram-positifs. Par contre, quelques-uns sont fortement gram-positifs et sporulés. On voit des spores libres à membrane seulement colorée.

0 h. 15 : Ne sont colorés que les quelques bacilles qui étaient préalablement notés comme gram-positifs. Tous les autres sont décolorés. C'est donc sur ces bactéries *jeunes* que la différenciation se poursuit.

0 h. 30 : Fond peu coloré, à peu près gram-négatif. Granulations gram-positives.

0 h. 45 : Fond gram-négatif. Granulations persistent.

1 h. 30 : — — —

1 h. 45 : Granulations difficiles à voir.

2 heures : Décoloration totale.

Ainsi qu'il était aisé de le prévoir en examinant les lames colorées avant l'action du réactif différenciateur, nous n'avons pas eu affaire à des cellules de 7 jours qui, mortes et en voie de lyse, étaient décolorées 15 minutes après action de ce réactif, mais aux éléments plus jeunes qui nous permettent donc de retrouver le résultat obtenu pour des cellules de 48 heures.

C) Conclusion.

On peut résumer ainsi les résultats obtenus :

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE.

Age de la culture	Durée de la décoloration totale
4 h. 30	2 h. 15
15 heures	2 heures
24 heures	2 heures
48 heures	1 h. 10
7 jours	0 h. 45

BACILLUS MESENTERICUS RUBER.

Age de la culture	Durée de la décoloration totale
24 heures	5 heures
48 heures	2 heures
7 jours	0 h. 15 environ

Nous vérifions donc que les bactéries jeunes sont plus résistantes à la décoloration que les bactéries âgées.

Nous remarquons en outre, dans le cas de la *Bactéridie Charbonneuse* où nous avons pu opérer sur des cellules très jeunes qu'il y a une assez longue période pendant laquelle la bactérie offre des temps de décoloration analogues et maxima. C'est ainsi que les cellules de 4 h. 30, 15 heures et 24 heures se décolorent en 2 heures environ, et beaucoup moins rapidement que les cellules plus âgées (48 heures, par exemple).

Il est donc un stade, variable avec la bactérie, où les cellules ne se transforment pas, tout au moins en ce qui concerne les constituants qui participent à la Réaction de GRAM. Ce stade correspond probablement à la période où la cellule est en pleine activité. La vieillesse correspond à une moindre résistance à la décoloration mais celle-ci est nette surtout lorsque la cellule morte est soumise à des processus de dégradation autolytique de plus en plus accentués.

CHAPITRE VI.

INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA RESISTANCE DE CELLULES DE LEVURE A LA DECOLORATION, APRES COLORATION PAR LA METHODE DE GRAM.

Dans le Chapitre IV de la II^e Partie de ce travail, relatif à l'influence de l'agent fixateur sur la résistance à la décoloration, nous avons établi l'allure de la décoloration de cellules de *Sac. Pastorianus* de 48 heures fixées par l'alcool-éther. (Courbe A, page 87).

Dans le chapitre suivant, nous avons établi l'allure de la décoloration du même organisme de même âge et fixé par le même réactif. (Courbe H, page 96).

La comparaison de ces deux courbes, représentant toutes deux l'allure de la décoloration de cellules de levure de 48 heures fixées à l'alcool-éther montre qu'elles sont différentes. C'est ainsi que, dans le premier cas, la décoloration est complète en 9 heures, tandis qu'il faut plus de 15 heures dans le second cas pour arriver au même résultat.

Or ces cellules proviennent de deux milieux de culture différents : carotte dans le premier cas et eau de levure maltosée dans le second cas. Nous avons là une vérification simple mais qualitative de l'influence du milieu de culture sur la résistance à la décoloration de mêmes organismes.

Le fait d'utiliser comme milieu l'eau de levure maltosée double donc environ la résistance à la différenciation, le milieu à la carotte étant pris comme type.

Nous avons étudié précédemment, dans la partie bibliographique de ce travail (p. 30 et suiv.) les opinions des princi-

paux Auteurs qui se sont occupés de cette question. A notre avis, une conclusion peut se tirer de ces divers travaux et de ces observations : nous connaissons le côté qualitatif du phénomène mais nous en ignorons le côté quantitatif. Nous savons que la nature du milieu de culture a une influence sur la résistance à la différenciation d'une espèce donnée, dans la méthode de GRAM, mais nous ne savons pas encore comment ni pourquoi s'exerce cette influence.

L'étude rationnelle, systématique, (en suivant une technique de différenciation ralentie analogue à celle que nous avons utilisée dans nos expériences), des variations de la résistance à la décoloration de cellules provenant d'un milieu de culture synthétique, dont on fera varier un par un les constituants en toute connaissance de cause, (en tenant compte, notamment, des facteurs d'acidité du milieu, si importants, qui en résultent) nous paraît de grande importance dans l'étude de la Réaction de GRAM.

En se rendant maître de la différenciation, en la ralentissant à son gré, on dispose d'un instrument de mesure suffisamment précis : la durée de différenciation.

Nous n'avons pas continué notre travail dans cet ordre d'idée car un autre problème, voisin d'ailleurs nous a paru devoir précéder celui-ci dans l'enchaînement normal de nos idées :

Connaissant la durée de décoloration d'une cellule donnée, ayant poussé sur un milieu de culture donné, soustraire de la cellule, aussi méthodiquement que possible, ses principaux constituants, établir, à chaque soustraction élective, sa courbe de résistance à la décoloration et tenter d'arriver à rendre la cellule gram-négative.

En d'autres termes, rechercher quelle part exacte jouent dans la résistance à la décoloration les principaux constituants cellulaires.

Cette étude constitue l'objet du Chapitre suivant.

CHAPITRE VII.

INFLUENCE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS CELLULAIRES (LIPIDES, NUCLEOPROTIDES, LIOPROTIDES) SUR LA RESISTANCE A LA DECOLORATION DE CELLULES DE LEVURE COLOREES PAR LA METHODE DE GRAM.

Dans la partie bibliographique de ce travail (cf. p. 41) nous avons relaté les principales théories qui concernent la ou les substances gramophiles et nous avons montré que les différents Auteurs attribuant la Réaction de GRAM à un constituant donné de la cellule arrivent à cette conclusion en constatant que l'élimination de ce constituant fait perdre à la cellule envisagée son caractère gram-positif.

C'est ainsi que SCHUMACHER éliminant de la cellule de levure les lipides libres par l'alcool ou l'éther constate que la cellule garde le Gram. Il élimine ensuite les nucléoprotides par l'acide chlorhydrique dilué. La cellule garde encore le Gram. Éliminant enfin les lipoprotides par hydrolyse acide en milieu alcoolique et constatant que la cellule devient gram-négative, il en conclut que ces constituants cellulaires sont les facteurs essentiels de la Réaction de GRAM.

Nous avons repris ces expériences en essayant d'éliminer successivement et aussi électivement que possible les principaux constituants cellulaires.

Pour cela, opérant nous aussi sur des cellules de levure, nous avons entraîné les lipides libres, les nucléoprotides et les lipoprotides mais en étudiant quantitativement, après chaque soustraction, le comportement des cellules vis-à-vis de la Réac-

tion de GRAM. La technique de différenciation ralentie que nous avons suivie précédemment nous permet de construire les courbes de résistance de la levure choisie après élimination successive des trois principaux constituants. La comparaison de ces courbes avec celle qui représente l'allure de la décoloration de la même levure n'ayant subi aucun traitement indiquera l'importance des lipides libres, des nucléoprotides et lipoprotides sur la résistance à la différenciation.

Cette étude est en quelque sorte quantitative puisqu'elle permet de mesurer et d'exprimer par une courbe l'influence des divers constituants cellulaires dans la Réaction de GRAM. L'appréciation qualitative au contraire, faite par les Auteurs précédents, nous paraît beaucoup moins rationnelle et peut amener à des conclusions erronées. En effet, si le traitement d'une cellule par un réactif susceptible d'entraîner un constituant donné laisse la cellule qualitativement gram-positive, il est téméraire d'affirmer que ce constituant n'est pas le support de la Réaction. Il se peut en effet qu'il en soit un des supports et que sa soustraction rende la cellule beaucoup moins résistante à la décoloration, quoique encore gram-positive.

1°) Technique d'expérimentation.

Ces expériences furent exécutées avec des cellules de *Saccharomyces Pastorianus* de 48 heures, cultivées en eau de levure maltosée à l'étuve à 24°. Une assez grande quantité de cellules de levure étant nécessaire, nous avons dû ensemencer simultanément un certain nombre de tubes contenant le même milieu de culture et maintenu à l'étuve à 24°. Au bout de 48 heures, le contenu des tubes de culture est réuni et centrifugé. Le culot est lavé à plusieurs reprises à l'eau bidistillée. Pour la fixation, la coloration et la différenciation, nous avons suivi exactement la technique employée précédemment et résumée page 72.

II^o) Etude de la décoloration de cellules de *Sac. Pastorianus* de 48 heures, ayant poussé en eau de levure maltosée, fixées 1¹/₂ minute par le liquide de Regaud, avant toute soustraction de leurs constituants.

Nous avons établi, sur une petite quantité du culot obtenu, cette courbe de décoloration, en opérant de la même façon que précédemment. (cf. p. 72).

Il nous suffit donc de transcrire nos résultats. Ils constituent le graphique K.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
1 heure	1232	20	1,60 %
2 heures	1175	42	3,45
3 heures	1224	53	4,10
24 heures	1120	334	22,75
26 heures	959	367	27,67
28 heures	1038	419	28,70
32 heures	814	495	38,46
35 heures	783	1237	61,40
36 heures	500	1250	71,40

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique K, page 112).

Nous retrouvons la courbe en S typique, mais très étalée à cause de la grande résistance à la décoloration, ce qui explique aisément puisque le milieu de culture, nous l'avons vu précédemment (p. 103) rend la levure fortement gram-positive et que le fixateur utilisé est un des meilleurs fixateurs cytologiques, conservant bien par conséquent les constituants cellulaires.

III^o) Etude de la décoloration de cellules de *Sac. Pastorianus* de 48 heures privées des lipides libres.

Dans cet essai, ce qui reste du culot de levure (la plus grande partie) précédemment obtenu a été traité par les solvants des lipides libres de la manière suivante :

Le culot de levure bien essoré est mis en contact avec de l'acétone purifiée neutre pendant 48 heures, dont 4 heures dans un appareil à secousses. Après centrifugation, le culot est mis en contact avec un mélange à parties égales d'acétone et d'éther neutres, pendant 48 heures, dont 4 heures dans un appareil à secousses. Après centrifugation pour éliminer ce réactif, le culot de levure est mis en contact pendant 5 jours avec de l'éther neutre. On centrifuge. L'éther obtenu n'abandonnant aucun résidu à l'évaporation, les lipides libres sont totalement éliminés.

Une partie de ce culot étalée sur lames après fixation au liquide de REGAUD pendant 1 minute servira à établir la courbe de décoloration. On procède, pour la coloration et la différenciation, comme précédemment. (p. 71).

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
0 heure	662	45	6,45 %
2 heures	535	105	16,40
4 heures	797	203	20,30
6 h. 30	1020	480	32,00
10 h. 25	938	936	50,00
15 heures	332	1304	79,70
16 h. 45	113	835	87,88
19 h. 30			100,00

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique L., page 112).

Les résultats précédents nous montrent que :

1) Le traitement par les solvants neutres des lipides, à froid, rend 6,45 % des cellules de levure gram-négatives.

2) Les lipides libres ont une influence sur la résistance à la différenciation, en ce qui concerne tout au moins les cellules de levure, puisque leur élimination rend la cellule environ 2 fois moins résistante à la décoloration.

3) Qualitativement, les cellules privées de leurs lipides

libres sont encore gram +. On conçoit donc bien que de simples recherches qualitatives conduisent à la conclusion erronée : Puisque les cellules sont toujours gram +, c'est que les lipides ne constituent pas la substance gramophile.

IV^o) Etude de la décoloration de cellules de *S. Pastorianus* de 48 heures privées des lipides libres et des nucléoprotides.

Nous avons tenu à employer une technique qui enlèverait électivement de la cellule les nucléoprotides sans altérer les autres constituants.

DEUSSEN, en 1918-21, avait remarqué que parmi les principaux constituants cellulaires, seuls les nucléoprotides, et plus spécialement leurs produits de dédoublement (nucléides, acide nucléique) prennent le Gram. En effet les traitements chimiques susceptibles de détruire les nucléoprotides de la cellule (acides, alcalis, ferments protéolytiques) la rendaient gram-négative. A l'encontre de cette théorie nous avons vu que SCHUMACHER avait constaté que le traitement de la cellule de *Lepture* par l'acide chlorhydrique dilué la laissait gram-positive. Ces traitements, malheureusement, ne sont pas électifs. Ils n'éliminent pas seulement les nucléoprotides. C'est ce qui nous a conduit à employer dans nos recherches la technique de JAVILLIER (1929) qui extrait pratiquement tous les nucléoprotides d'une poudre de tissus par une solution bouillante d'un sel neutre. Une solution de chlorure de sodium constitue, pour JAVILLIER, le solvant de choix pour la dissolution des protides nucléaires.

Nous avons donc procédé ainsi pour éliminer les nucléoprotides. Les cellules délipidées par le traitement précédent sont traitées par une solution de chlorure de sodium à 15 % bouillante, en suivant exactement la technique publiée par JAVILLIER, page 668 de son Mémoire et que nous rappelons ci-dessous :

« Placer la poudre dans un bécber de 10 cc. en Pyrex. Délayer soigneusement avec très peu de solution de NaCl à 15 %. Broyer patiemment avec un agitateur à extrémité aplatie pour imprégner la poudre et briser les grumeaux, puis ajouter 40 cc. de la même solution de NaCl bouillante. Porter le bécber sur la flamme réglée d'un bec Bunsen. Réatteindre l'ébullition et la maintenir modérée 12 à 13 minutes. Pendant tout ce temps réamener dans le liquide les particules de matière soulevées par la mousse et s'attachant aux parois. Remplacer aussi par de l'eau bouillante celle qui s'évapore. Retirer du feu. Laisser refroidir. Transvaser. Compléter à 50 cc. avec la solution saline. Maintenir 6 heures en contact. Agiter fréquemment. »

Une centrifugation peu rapide sépare ensuite un culot de levures qu'on lave à six reprises à l'eau distillée.

Une petite partie est fixée au liquide de REGAUD pendant 1 minute, lavée six fois à l'eau bi-distillée, étalée sur lames et sert à étudier la vitesse de décoloration de cellules privées des lipides et des nucléoprotides (courbe M). La plus grosse partie du culot servira au traitement suivant.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram —	Pourcentage de cellules décolorées
0 heure.	696	52	6,95 %
1 heure.	1047	613	36,90
2 h. 30	304	546	63,52
6 h. 30	101	457	81,80
9 h. 30	75	558	88,10
13 h. 30	78	922	92,20
16 h. 30	44	716	92,76
19 h. 30	28	512	94,80

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique M, page 112).

En comparant la courbe L. et la courbe M, on voit facilement que la dénucléoprotidation de la cellule de *levure* la rend moins résistante à la décoloration. Alors que, en 10 h. 25 par exemple, 50 % des cellules délipidées sont décolorées, 88,10 % des cellules délipidées et dénucléoprotidées sont décolorées en 9 h. 30 de décoloration seulement.

Les nucléoprotides, dans le cas de la cellule de *levurè*, participent donc à la réaction de GRAM.

Cependant les cellules de *levure* privées de leurs lipides libres et de leurs nucléoprotides sont encore *qualitativement* gram-positives alors qu'elles le sont beaucoup moins, au point de vue *quantitatif*. Cela explique les conclusions erronées auxquelles arrivent les auteurs ayant étudié l'influence de ces constituants cellulaires au point de vue qualitatif seulement.

V°) **Etude de la décoloration de cellules de *Sac. Pastorianus* de 48 heures privées des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides.**

Nous avons suivi, dans cette expérience, la technique de SCHUMACHER qui élimine les lipoprotides par l'hydrolyse acide au moyen d'alcool-chlorhydrique, à froid. La combinaison est dissociée et les lipides acides libérés passent en solution dans l'alcool. Nous avons ajouté cependant un lavage à l'éther-acétone *aa p. e.* pour éliminer les lipides insolubles dans l'alcool et solubles dans ces deux solvants.

Nous avons donc procédé ainsi pour éliminer les lipoprotides :

Le culot de *Levure* privé par les traitements précédents des lipides libres (entraînés à froid par les solvants organiques) et des nucléoprotides (entraînés par une solution bouillante d'un sel neutre) est mis en contact avec un grand volume d'alcool chlorhydrique à 10 % (HCl pur, 5 parties, alcool à 96°... 45 parties). On ajoute quelques perles de verre et on maintient 24 heures en contact à la température ambiante, et en agitant fréquemment. On centrifuge et on lave à trois reprises avec un grand volume d'eau distillée pour arrêter l'action du réactif. Le culot est mis en contact avec de l'éther-acétone. Après 24 heures de contact on centrifuge. Le culot collecté, privé des réactifs précédents est fixé en bloc à l'aide du liquide de REGAUD pendant 1 minute. On lave à trois reprises avec un grand volume d'eau distillée et en centrifugeant, selon la technique habituelle.

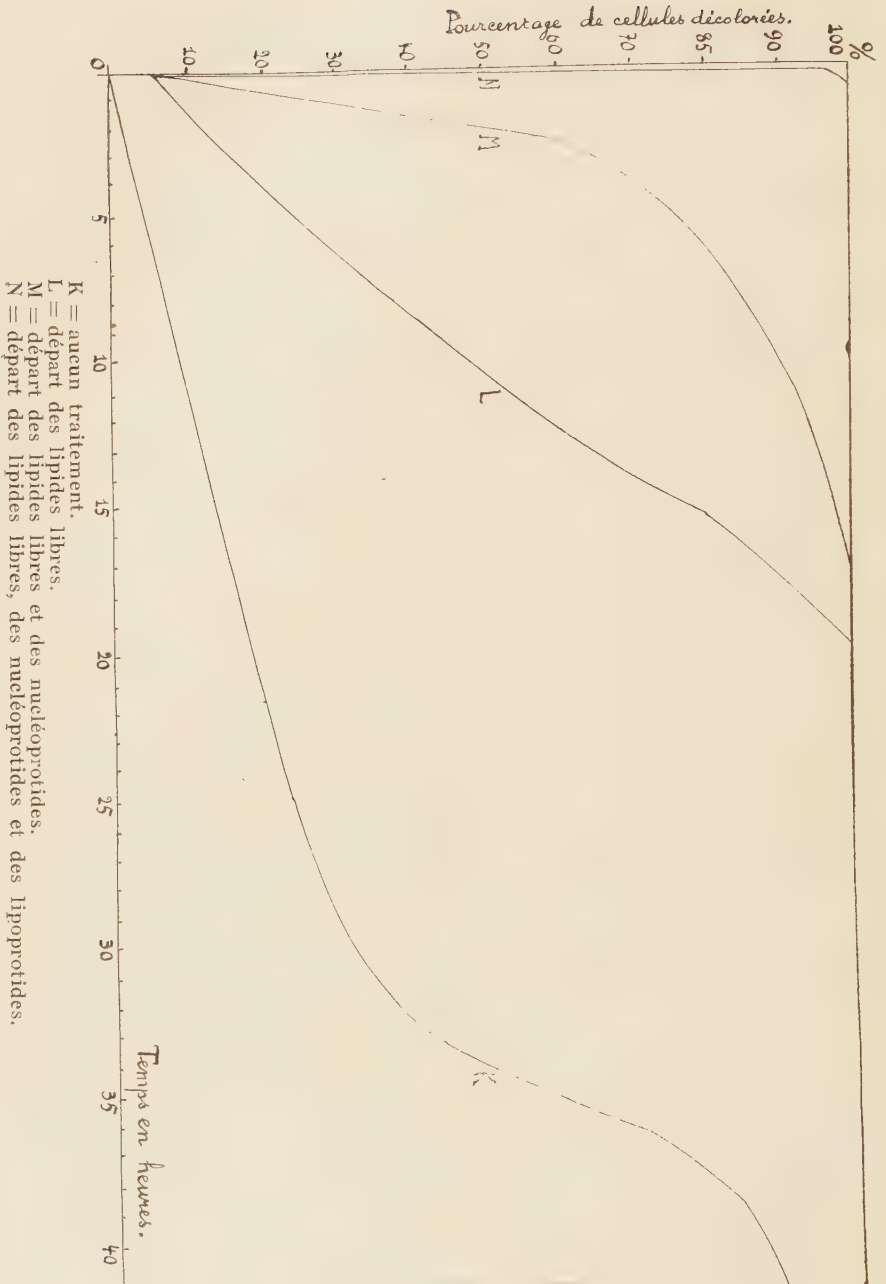
Le culot de *levures*, constitué de cellules privées des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides est étalé. On pratique comme précédemment la coloration et la décoloration.

Les résultats sont condensés dans le tableau ci-dessous et s'inscrivent sur le graphique N, page 112.

Temps de décoloration	Cellules Gram +	Cellules Gram -	Pourcentage de cellules décolorées
0 heure.	420	40	8,30 %
0 h. 10	8	300	97,40
0 h. 20	7	420	98,30
0 h. 30			99,00

(Ces résultats s'inscrivent sur le graphique N).

INFLUENCE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS CELLULAIRES SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.



VI) Conclusion :

En comparant les résultats obtenus après l'élimination successive des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides, on constate qu'un organisme très fortement gram-positif (*S. Pastorianus*) est devenu pratiquement gram-négatif.

Le *Saccharomyces Pastorianus* cultivé en eau de levure maltosée pendant 48 heures, fixé au REGAUD pendant une minute fournit en effet les chiffres suivants :

1) Cellules intactes : Résistance à la décoloration : 42 heures environ.

2) Cellules privées des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides : 0 heure 10 environ.

D'autre part, la résistance de la cellule de levure s'est affaiblie régulièrement au fur et à mesure de l'élimination des principaux constituants : lipides, nucléoprotides et lipoprotides.

En conclusion enfin, **l'élimination élective des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides de la cellule de levure montre que ces trois constituants cellulaires participent à la réaction de Gram.**

CHAPITRE VIII.

CONCLUSIONS DES RECHERCHES PERSONNELLES

Les recherches d'ordre quantitatif introduites dans l'étude de la Réaction de GRAM par NEIDE offrent une méthode d'investigation qui nous paraît de grande utilité dans l'étude théorique de la Réaction.

Le peu de précision qui entoure les conclusions de beaucoup de travaux scientifiques concernant le mécanisme de la Réaction de GRAM nous paraît dû, pour une grande part, à ce que les divers auteurs ne semblent pas avoir compris toute l'importance de la substitution d'une étude quantitative ardue, mais précise, à une étude qualitative rapide évidemment, mais imprécise.

Nous inspirant des travaux de NEIDE, nous avons mis au point une technique de coloration et de décoloration s'appliquant à une expérimentation rationnelle sur des cellules de levure (*Sac. Pastorianus*), et, dans, une partie de nos recherches, à une expérimentation sur deux bactéries.

Nous avons précisé, à l'aide de cette méthode, l'allure de la décoloration de cellules de levure colorées par la méthode de GRAM et l'influence sur la décoloration des agents fixateurs, de l'âge des cellules, de la nature du milieu de culture, et des principaux constituants cellulaires.

1°) ALLURE DE LA DÉCOLORATION.

A. La décoloration des cellules de levure est progressive. En général, apparaissent, au cours de la décoloration, des granulations fortement gram-positives qui tranchent sur le fond des cellules qui se décolorent rapidement. La décoloration de ces granu-

lations disparaît enfin et la cellule devient gram-négative. Il semble, en général, que la zone externe de la cellule — sans pouvoir préciser davantage — résiste plus longtemps à la décoloration que la zone la plus interne.

B. Les diverses cellules constituant une culture d'âge donné résistent très différemment à la décoloration. Certaines sont décolorées rapidement, d'autres en des temps plus ou moins longs, ce qui semble, à prime abord, enlever toute valeur à la notion du « **Gram-Daüer** » de NEIDE. Mais si l'on représente graphiquement ces résultats, en notant les temps d'action du décolorant en abscisses et le pourcentage des cellules décolorées en ordonnées, les résultats s'inscrivent très régulièrement sur une courbe en S semblable à celles qui traduisent une réaction monomoléculaire. Nous avons pensé que c'était la variation d'un facteur unique, peut-être l'âge de la cellule, toutes choses égales d'ailleurs, qui était à la base des différences observées et nous avons cherché à vérifier cette hypothèse.

2°) INFLUENCE DES AGENTS FIXATEURS SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION DE CELLULES DE LEVURE COLORÉES PAR LA MÉTHODE DE GRAM.

Cette étude, seulement esquissée jusqu'ici, nous paraît très importante si l'on considère les transformations tant physiques que chimiques que font subir aux cellules les agents fixateurs en tuant et coagulant leur cytoplasme.

Nous avons étudié cinq fixateurs : l'alcool-éther, le *fixateur* de BOUIN, le *fixateur* de MÜLLER-FORMOL, le « *sublimé-acétique* » et le *fixateur* de CHAMPY. Les graphiques obtenus nous montrent que l'agent fixateur a une grande influence sur la résistance à la décoloration. Avec de mauvais fixateurs cytologiques tels que l'alcool-éther, la décoloration est pratiquement totale en 9 heures. Avec le liquide de BOUIN, le MÜLLER-FORMOL et le sublimé-acétique, il faut 11 à 15 heures pour arriver au même résultat tandis que les mêmes cellules, fixées à l'aide du liquide de CHAMPY, demandent 40 heures environ pour se décolorer.

On peut remarquer que le liquide de CHAMPY est un bon conservateur du chondriome et des lipides non saturés. Cependant

le MÜLLER-FORMOL conserve également bien le chondriome et rend la cellule beaucoup moins résistante à la décoloration. Il est vrai que ce réactif n'a agi que pendant 30 secondes, sans post-chromisation.

De plus, les graphiques obtenus pour ces 5 réactifs sont sensiblement parallèles et seulement décalés les uns par rapport aux autres. Pour atteindre le seuil de la décoloration, il faut un temps variable avec l'agent de fixation employé. Lorsque ce seuil est atteint, la décoloration se poursuit ensuite sensiblement suivant le même rythme. Nous retrouvons les mêmes courbes en S et ceci fortifie l'hypothèse que nous émettions au paragraphe précédent : C'est à la variation d'un facteur unique, probablement l'âge de la cellule, qu'il faut attribuer les différences individuelles qu'on observe. Cette étude constitue le sujet du chapitre suivant.

En conclusion, la nature de l'agent de fixation est très importante dans la Réaction de GRAM et les fixateurs-type du chondriome qui conservent aussi le mieux, lipides et combinaisons lipoprotidiques, semblent les meilleurs agents de fixation.

3°) INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA CELLULE SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.

A) Etude de la résistance à la décoloration de cellules de levure (*Sac. Pastorianus*) d'âge différent.

Il faut plus de 30 heures pour décolorer 90 % de cellules de 8 heures, plus de 25 heures quand il s'agit de cellules de 24 heures, moins de 15 heures quand il s'agit d'une culture de 48 heures, moins de 10 heures quand il s'agit de culture de 6 jours et moins de 6 heures quand il s'agit d'une culture de 15 jours.

Donc les cellules de *levure* résistent d'autant plus à la décoloration qu'elles sont plus jeunes.

Les graphiques obtenus, d'autre part, ne montrent pas la courbe en S pour les cellules jeunes (culture de 8 heures) ou très âgées (cultures de 6 et 15 jours). On peut penser qu'aux différents paliers de la courbe en S correspondent des cellules

d'âge différent; Les cellules les plus âgées sont décolorées les premières, les cellules les plus jeunes sont décolorées les dernières. La portion intermédiaire de la courbe, assimilable à une droite de forte pente, traduisant une décoloration brutale, correspondrait alors à la grande quantité de cellules de même âge, et qu'on considère implicitement quand on parle de cellules de 24 ou 48 heures par exemple.

De plus, il semble légitime d'expliquer ainsi pour une part, tout au moins, l'influence de l'agent de fixation : selon qu'il conservera mieux ou moins bien les lipides et certaines combinaisons lipoprotidiques, substances que contiennent en grande quantité les cellules adultes, la première portion de courbe sera plus ou moins allongée. Nous avons observé, en effet, que l'influence de l'agent de fixation se manifestait essentiellement sur cette première portion de courbe.

B) Etude de la résistance à la décoloration de Bactéries d'âge différent.

a) L'adaptation de notre technique d'expérimentation à des Bactéries nous a permis de retrouver sur la *Bactéridie charbonneuse* et le *Bacillus Mesentericus Ruber* les résultats précédents :

Avec une culture de *B. Charbonneuse* âgée de 4 h. 30, il faut 2 h. 15 pour atteindre la décoloration totale tandis que 1 h. 10 suffisent pour décolorer complètement une culture de 48 heures.

Avec une culture de *B. Mesentericus Ruber* de 24 heures, il faut 5 heures pour atteindre la décoloration totale tandis que 2 heures suffisent pour décolorer complètement une culture de 48 heures.

Les Bactéries jeunes résistent donc plus longtemps à la décoloration que les Bactéries âgées.

b) Cette étude nous a fait remarquer, en outre, dans le cas de la Bactéridie charbonneuse, où nous avons pu opérer sur des cellules très jeunes, qu'il y a une assez longue période pendant laquelle la Bactérie offre des résistances à la décoloration analogues et maxima. C'est ainsi que des cellules de 4 h. 30, 15 h., 24 h. se décolorent en 2 heures environ, tandis que les mêmes cellules âgées de 48 heures se décolorent en 1 h. 10 seulement.

Il est donc un stade variable avec la Bactérie, où les cellules ne se transforment pas, tout au moins en ce qui concerne leurs constituants gramophiles.

Ce fait nous permet de penser que la moindre résistance des cellules bactériennes, à partir d'un certain âge, provient de leur moindre vitalité et correspond ensuite à leur mort et aux divers processus autolytiques de digestion.

4°) INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.

Nous avons esquissé cette étude par la comparaison des courbes de décoloration de cellules de *Sac. Pastorianus* de même âge provenant de deux milieux de culture différents. Nous avons pu montrer cependant l'intérêt que présenterait cette étude entreprise au point de vue quantitatif à l'aide de milieux synthétiques c'est-à-dire de composition exactement connue.

5°) INFLUENCE DES LIPIDES, NUCLÉOPROTIDES ET LIPOPROTIDES CELLULAIRES SUR LA RÉSISTANCE A LA DÉCOLORATION.

Nous avons repris les expériences de SCHUMACHER en éliminant successivement ces constituants cellulaires et en étudiant, après chaque soustraction, *quantitativement*, la résistance à la décoloration des cellules obtenues. Nous avons suivi la technique de SCHUMACHER en ce qui concerne l'élimination des lipides solubles dans les solvants neutres et des lipoprotides hydrolysables par l'alcool chlorhydrique mais nous avons utilisé, pour l'extraction des nucléoprotides une méthode moderne due à JAVILLIER et basée sur leur facile solution dans les solutions de sels neutres à chaud. Nous avons obtenu les résultats suivants :

A) Le traitement par les solvants neutres des lipides, à froid, rend environ 6,45 % des cellules de levure gram-négatives. (Culture de 48 heures).

B) Les cellules de levure privées de leurs lipides libres, et

de leurs nucléoprotides sont encore moins résistantes à la décoloration.

C) Les cellules de levure privées de leurs lipides libres, de leurs nucléoprotides et de leurs lipoprotides sont à peu près gram-négatives. (Décoloration en 9 h. 30 au lieu de 40 heures environ).

L'élimination élective des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides montre donc, en ce qui concerne les cellules de *Sac. Pastorianus*, que ces trois constituants participent à la Réaction de Gram et peuvent être considérés comme les substances gramophiles essentielles de ces cellules.

TROISIEME PARTIE

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La Réaction de GRAM, qu'on emploie si communément comme coloration différentielle des Bactéries, depuis un temps déjà considérable, est encore très douteuse dans son mécanisme. Une théorie satisfaisante de la Réaction semble devoir être capable d'expliquer les points suivants que nous résumons ci-dessous et que nous avons mis en évidence lors de notre étude bibliographique de la Réaction et de nos recherches personnelles. Ce sont des faits bien établis et qui, par conséquent, doivent être à la base de toute explication de la Réaction de GRAM.

Les cellules gram-positives et gram-négatives sont perméables à l'iode en solution aqueuse et le complexe « violet de gentiane+iode » se forme dans toutes les cellules. Ce complexe est très peu soluble dans l'alcool et il doit, d'autre part, exister un équilibre entre cet état de solution du complexe et la solution alcoolique des deux constituants résultant de la dissociation du complexe. Chez les Bactéries gram-positives, les cellules étant peu perméables à l'iode en solution alcoolique (KAPLAN et KAPLAN), le complexe sera énergiquement retenu. L'iode résultant de la dissociation alcoolique du complexe ne pouvant sortir que très difficilement de la cellule se combine suivant la loi d'action de masse avec le colorant. On conçoit donc qu'on ne peut arriver à rendre une telle cellule gram-négative que par une action très prolongée du décolorant. Chez les Bactéries gram-négatives, au contraires, la haute perméabilité à l'iode en solution alcoolique permet la sortie du colorant et de l'iode

résultant de la dissociation par l'alcool du complexe. La décoloration sera donc très rapide, quasi instantanée.

D'ailleurs, cette explication ne trouve-t-elle pas un argument précieux dans ce fait que, jusqu'à une certaine dilution, l'addition d'eau au décolorant augmente beaucoup son pouvoir décolorant. Ce fait n'est-il point dû à un changement dans la perméabilité de la cellule, ainsi que, évidemment, à une modification dans l'état des solutions du colorant et de l'iode qui se forment (L'iode est sous forme de l'ion complexe ¹³ en solution aqueuse et sous forme moléculaire, en solution alcoolique).

Nous pouvons ajouter aussi, à l'appui de cette explication, l'observation de BÉGUET qui montre que la tension superficielle du décolorant conditionne son énergie. La décoloration serait, d'après cet auteur, d'autant plus intense que la tension superficielle du liquide employé est plus basse. BÉGUET montre aussi que la *Bactéridie charbonneuse*ensemencée sur un milieu de culture dont on a abaissé la tension superficielle à la limite de développement possible n'est plus que très faiblement gram-positive. Or la perméabilité d'une cellule doit varier avec l'état physico-chimique du milieu qui l'entoure et à variation de perméabilité correspond variation de résistance à la décoloration. Dans de telles expériences, il faut évidemment se garder de conclure trop vite car il est certain que d'autres facteurs que la perméabilité varient quand on modifie aussi intensément les conditions de vie de cellules, (et notamment les conditions de nutrition).

En résumé, il y a certainement à envisager, dans la Réaction de GRAM :

1) des phénomènes physiques d'adsorption du complexe « violet de gentiane+iode » au niveau de certains micelles du cytoplasme.

2) la perméabilité de la cellule, et particulièrement la faible perméabilité des cellules gram-positives à l'iode en solution alcoolique.

Cependant ces considérations physiques, qui ont leur importance, ne doivent pas, à notre avis, primer les facteurs chimiques de la Réaction de GRAM. Il convient d'essayer de relier les données physiques et les données chimiques.

Les phénomènes physiques d'adsorption du complexe « violet de gentiane+iode » au niveau de micelles de cytoplasme doivent préparer et renforcer une réaction (ou une série de réactions) chimique prépondérante. La résistance énorme à la décoloration qu'offrent certaines cellules gram-positives (nous avons vu des cellules de levure résister plus de 17 jours à l'éther-acétone : 1/3) permet de croire qu'il y a autre chose qu'un simple phénomène d'adsorption et qu'il doit se former un complexe solide résultant de la combinaison du violet de gentiane, de l'iode et d'une ou plusieurs substances gramophiles. Citons aussi l'hypothèse de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER attribuant la réaction aux lipides à acides gras non saturés. Citons l'influence des réactifs fixateurs qui rendent, ainsi que nous l'avons établi, une cellule gram-positive d'autant plus résistante à la décoloration que le fixateur conserve le mieux les lipides et les combinaisons lipidiques. Notons également que la Réaction de GRAM est conditionnée par l'emploi de colorants spécifiques des lipides (violet de gentiane, violet de méthyle, bleu Victoria, etc...).

D'autre part, il importe de tenir compte des travaux de STEARN et STEARN et de leur théorie physico-chimique de la Réaction : Le complexe gramophile serait essentiellement formé de lécithoprotides qui, s'oxydant par l'iode, deviennent plus acides et voient s'accroître leur affinité pour les colorants basiques.

Sans vouloir proposer une théorie définitive de la Réaction de GRAM, on peut, en résumé et dans l'état actuel de nos connaissances, interpréter ainsi le mécanisme de la Réaction de Gram :

- 1) **La Réaction de Gram résulte, pour une part, de la faible perméabilité à l'iode en solution alcoolique des cellules gram-positives.**
- 2) **Elle résulte aussi de l'adsorption du colorant à la surface des micelles cytoplasmiques et notamment des nucléoprotides. (cette phase précède et prépare la combinaison chimique).**
- 3) **Elle résulte surtout de la combinaison du complexe de Gram avec certains lipides, et particulièrement avec certaines combinaisons lipoprotidiques à acides gras non saturés.**

Quand au siège de la Réaction de Gram, il semble bien établi actuellement que c'est le cytoplasme, la membrane ne contenant pas

de combinaisons lipoprotidiques. La décoloration moins rapide de la partie périphérique du cytoplasme semble due à une concentration dans cette région des lipides endoplasmiques.

La différenciation des Bactéries par la Méthode de GRAM ne constitue donc pas une simple réaction tinctoriale. Elle révèle de profondes différences physico-chimiques de la structure cellulaire des deux groupes, mal connues encore, mais qui justifient amplement son emploi, non seulement dans le diagnostic clinique, mais aussi pour la classification.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

L. LUTZ.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALBERT (R. ET W.). 1901. Chemische Vorgänge in der abgetöteten He-
fezellen. *Zentr. f. Bakt., 2 Abt.*, 7, p. 737.
- ATKINS (K. N.). 1920. Report of committee of descriptive chart. Part. III.
A modification of the Gram stain. *Journ. of Bact.*, 5, p. 321.
- BACH (D.) et DELÉTANG (R.). 1931. Contribution à l'étude de la Réaction
de Gram. *C. R. Soc. Biol.*, 107, p. 666.
- BÉGUET (M.).
 (1) 1929. Sur les limites de la spécificité de la Réaction de Gram.
C. R. Soc. Biol., 101, p. 894.
 (2) 1929. Sur le mécanisme de la méthode de Gram. *C. R. Soc. Biol.*,
101, p. 896.
- BENIANS (T. H. C.).
 (1) 1912. Observations on the gram-positives and acid-fast proper-
ties of Bacteria. *Jour. of Pathol. and Bacter.*, 17, p. 199.
 (2) 1919-20. A further investigation into the principles underlying
Gram's stain, with special reference to the bacterial cell mem-
brane. *Jour. of Pathol. and Bacter.*, 23, p. 401.
- BRAEM (C.). 1888. Untersuchungen über die Degenerations erscheinungen
pathogener Bakterien im distillaten Wasser. *Beit. z. pathol.*
Anat. und zur Allgem. Pathol., 7, p. 11.
- BRUDNY (V.). 1908. Ueber die Beziehung zwischen der Färbbarkeit der
Bakterien nach Gram und ihrer Permeabilität. *Zentr. f. Bakt.*,
2 Abt., 21, p. 62.
- BÜRGERS. 1911. Ueber auflösungsercheinungen an Bakterien. *Zentr. f.*
Bakt., 1 Abt., Refer., 50, p. 125*.
- BURKE (V.). 1922. Notes on the Gram stain with description of a new
methode. *Jour. of Bacter.*, 7, p. 159.
- BURKE (V.). and BARNES (M. W.). 1929. The cell wall and the Gram reac-
tion. *Jour. of Bacter.*, 18, p. 69.
- CEDERKREUTZ. 1908. Studien über die Bedingungen des positiven und
des negativen Ausfallens der Gramfärbung bei einigen Bakte-
rien. *Arch. f. Dermat. u. Syph.*, 93, n° 3, p. 369.
- CHURCHMAN (J. W.).
 (1) 1912. The selective bactericidal action of gentian violet. *Jour.*
of experim. Med., 16, p. 221.

- (2) 1920-21. The cause of the parallelism between the Gram reaction and the gentiana violet reaction. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Medic.*, 18, p. 17.
 - (3) 1921. The therapeutic significance of the Gram reaction. *Bull. John Hopkins Hosp. Baltimore*, 32, p. 225.
 - (4) 1921. Further studies on the behavior of Bacteria toward gentian violet. *Jour. of experim. Med.*, 33, p. 569.
 - (5) 1927. Stability of the Gram reaction. *Stain technol.*, 2, p. 21.
 - (6) 1927. The structure of *Bacillus Anthracis* and the reversal of Gram reaction. *Jour. of experim. Med.*, 56, p. 1007.
 - (7) 1929. Gram structure of cocci. *Jour. of Bacter.*, 18, p. 413.
- CLAUDIUS. 1897. Méthode de coloration à la fois simple et contrastante des microbes. *Ann. Ins. Pasteur*, 11, p. 332.
- COMBERG (M.). 1932. Ueber die ursache der Gram-Veränderlichkeit anärober Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.*, 88, p. 423.
- COUDRAY (J.). 1929. Contribution à l'étude de la coloration de Gram. *Thèse Doct. Univ. Fac. Nancy*.
- CZAPLEWSKI. 1896. Bemerkungen zur Gramschen Methode der Bakterienfärbung. Eine zweckmässige Nachfärbung zur Gramschen Methode. *Hyg. Rundschau*.
- DELÉTANG (R.). 1932. Contribution à l'étude de la Réaction de Gram. Action de divers fixateurs sur la résistance à la décoloration. *C. R. Soc. Biol.*, 109, p. 162.
- DEUSSEN (E.).
- (1) 1918. Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektions. Krankh.*, 85, p. 234.
 - (2) 1920. Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Zeitschr. f. Hyg.*, 93, p. 512.
 - (3) 1921. Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Bioch. Zeitschr.*, 103, p. 123.
- DREYER (G.), SCOTT (S. G.) and WALKER (E. W. A.). 1911. Preliminary note on the nature of Gram staining. *Jour. of Pathol. and Bacter.*, 16, p. 146.
- EISENBERG (PH.).
- (1) 1909. Studien zur Ektoplasmatheorie. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.* 49, p. 465.
 - (2) 1910. Ueber die Tuschedifferenzierung gramnegativer Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.* 56, p. 183.
 - (3) 1910. Studien zur Ektoplasmatheorie. IV. Zur Theorie der Gramfestigkeit. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.* 56, p. 193.
 - (4) 1912. Ueber Bakterienfärbung mit sauren und neutralen Farbstoffen. Zugleich Beitrag zur Theorie der Gramfärbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Refer.* 54, p. 145*.
 - (5) 1918. Untersuchungen über halbspezifische Desinfektionsvorgänge. I Mitt., Ueber die Wirkung von Farbstoffen auf Bakte-

- rien Vitalfärbung Entwicklungshemmung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig. 71*, p. 420.
- (6) 1918. Ueber spezifische Adsorption in Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig. 81*, p. 72.
- (7) 1918. Untersuchungen über spezifische Desinfektions vorgänge. II Mitt., Ueber die Wirkung von Salzen und Ionen auf Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig 82*, pp. 69-208.
- (8) 1918. Ueber Gramelectriczuchtung. *Deuts. Medic. Wochenschr., 44*, p. 1079.
- (9) 1919. Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. VII Mitt., Ueber die Variabilität des Schleimbildungsvermögens und der Gramfestigkeit. *Zentr. f. Bak., 1 Abt., Orig. 82*, p. 401.
- FISCHER (A.).
- (1) 1899. Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. *Iena*
- (2) 1903. Vorletungen über Bakterien. *Iena*.
- FLÜGGE (C.). 1896. Die Mikroorganismen. *Leipzig (F. C. W. Vogel)*.
- GASSNER (G.). 1918. Neuere Untersuchungen über Metachromgelnährböden gleizeilig ein Beitrag zur Theorie der Gram-Färbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., 81*, p. 477.
- GOTTHEIL (O.). 1901. Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. *Zentr. f. Bakt., 2 Abt., Bd. 7*, p. 430, etc.
- GRAM (C.). 1884. Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitlung Trochen Präparaten. *Forsch. d. Med., 2 Bd.*, p. 185.
- GRIMME (A.). 1902. Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig. 32*, p. 86.
- GUERBET (M.), MAYER (A.) et SCHAEFFER (G.). 1910. Sur les réactions microchimiques des corps gras et la réaction de Gram. *C. R. Soc. Biol., 63*, p. 353.
- GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL. 1933. Traité de cytologie végétale, *Le François, Paris*.
- GÜNTHER. 1898. Einführung in das Studium der Bakteriologie. *Leipzig*.
- GUTSTEIN (M.).
- (1) 1924. Ueber die färberische Darstellung des Bakterien-Ektoplasmas. Zugleich ein Beitrag zur Theorie der Gramschen Färbung. (*Session de la Société allemande de Microbiologie à Göttingen*). *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 93*, p. 233*.
- (2) 1924. Das Ektoplasma der Bakterien.
- I) Ueber eine allgemeine Methode zur Darstellung des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien. *Zentr. f. Bact., 1 Abt., Orig., 93*, p. 393.
- (3) 1925. Das Ektoplasma der Bakterien.
- II Mitt.) Ueber färberische Verschiedenheiten zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Ein Beitrag zur Theorie der Gramsche Färbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 94*, p. 144.
- (4) 1925. Ueber das Ektoplasma und der Kern der Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Refer., 78*, p. 561.

- (5) 1925. Das Ektoplasma der Bakterien.
III et IV Mitt.) Morphologie und Aufbau des Ektoplasmas der Grampositiver Bakterien. Zugleich ein Beitrag zur Theorie der Beizenfärbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.* 95, p. 1.
 - (6) 1926. Das Ektoplasma der Bakterien.
V Mitt.) Färberischer Nachweis und chemischer Bau des Ektoplasmas der gramnegativen Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.* 100, p. 1.
 - (7) 1927. Zur Theorie der Desinfektion. Mikrochemische Untersuchungen über Wirkung von Schwermetallen und Farbstoffen auf lebende Bakterien. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.*, 104, p. 410.
- HENRICI (A. T.). 1914. The staining of yeasts by Gram's method. *Jour. Med. Research*, 30, p. 409.
- HIJMANNS VAN DEN BERG. 1896. Ueber das Verhalten des Gonococcus zur Gramschen Färbemethode. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Bd* 20, p. 786.
- HOGGE (A.). 1893. *Ann. des maladies génito-urinaires*, 2, p. 281.
- HOTTINGER (R.). 1915. Beitrag zur Theorie der Färbung nach Gram. Kolloid-chemische-optische Gesichtspunkte. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig.*, 76, p. 367.
- JAVILLIER (M.). 1929. Le Phosphore nucléique des tissus et sa détermination quantitative. *Bull. Soc. Chimie biol.*, 11, p. 644.
- JENSEN. 1912. Ueber eine Modifikation der Gramfärbung, besonders mit Rücksicht auf die Gonokokkendiagnose. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 49, p. 1663.
- JOBLING (J. M.) and PATERSEN (W.). 1914. Bacterial anti-ferments. Studies on fermentation. *Jour. of exper. Med.*, 20, p. 452.
- KAPLAN (M. L.) and KAPLAN (L.). 1933. The Gram stain and differential staining. *Jour. of Bact.*, 25, p. 309.
- KEMP (H. A.). 1931. Gram reaction in crushed yeasts. *Stain Technol.*, 6 (2), p. 53, 3 fig.
- KENDALL. 1916. Bacteriology. *Philadelphia and New-York*, p. 183.
- KISKALT. 1904. Eine Modifikation der Gramschen Färbung. *Zentr. f. Bacter.*, 30, p. 281.
- KLINCKSIECK (P.) et VALETTE (TH.). 1908. Code des Couleurs. *P. Klincksieck, Paris*.
- KOPELOFF (N.) and BEERMAN (PH.). 1922. Modified Gram stains. *Jour. Inf. Dis.*, 21, p. 480.
- LANGERÓN (M.). 1925. Précis de Microscopie. *Masson, Paris*.
- LASSEUR (PH.) et SCHMITT, 1927. Etude de la Réaction de Gram. *Ann. Inst. Pasteur*, 41, p. 554.
- LEGROUX (R.) et MAGROU (J.). 1920. Etat organisé des colonies bactériennes. *Ann. Inst. Pasteur*, 24, p. 417.
- LUTZ (L.). 1919. Quelques considérations sur la recherche microscopique du gonocoque et sur une modification de la méthode de Gram applicable à sa coloration. *Bull. Sciences Pharmac.*, 26, p. 10.

- MILLS. 1892. Méningite à Pneumocoque. (*Référence dans Baumgartens Jahresberitch*).
- NEIDE (E.). 1903-04. Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speciesdiagnostic, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gramfärbung in Betracht Kommenden Faktoren. *Zentr. f. Bakt., 1 Orig., 35*, p. 508.
- NICOLLE (M.). 1895. Pratique des colorations microbiennes. *Ann. Inst. Pasteur, 9*, p. 664.
- NICOLLE (CH.). 1903. Modifications de la méthode de Gram par substitution d'une solution bromo-bromure à la solution iodo-iodurée ordinaire. *C. R. Soc. Biol., 55*, p. 359.
- NIKITIN. 1908. Contribution à l'étude de la coloration des microbes. *Arch. Russes de Pathol., 6*, pp. 132 et 162.
- PALTAUF. 1891-92. Zur Aetiologie des Skleroms des Rachens des Kehlkopfes der Luftrohre und der Nase. (Rhinoskleroma). *Wiener Klin. Wochensc., p. 28*.
- REICHERT (FR.). 1913. Beiträge zur Gramfärbung. *Inaug. Dissert. Heidelberg*.
- SCHMIDT. 1892. Zur Kenntniss der Bakterien der Säuglingsfaeces. *Wiener Klin. Wochensc.*
- SCHMITT (E.). 1920. Contribution à l'étude de la coloration de Gram. *C. R. Soc. Biol., 83*, p. 627.
- SCHUMACHER (J.).
- (1) 1923. Die Prozesse der Zellfärbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 89*, p. 206*.
 - (2) 1924. Zur Gramsche Färbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 93*, p. 266.
 - (3) 1925. Ueber die färberische Unterscheidung der Bakterien mittels der Victoriablau-Pyronin method. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 94*, p. 397.
 - (4) 1925. Ueber das Verhalten einiger basischer Farbstoffe zu Lipoiden. *Biochem. Zeitschr., 166*, p. 214.
 - (5) 1925. Ueber die chemische Zusammensetzung des Bakterienkerns. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 97*, p. 81.
 - (6) 1925. Zur Chemie der Zellkerne und einiger Nucleinsäureeiweißverbindungen. *Chemie der Zelle und Gewebe., 12*, p. 192.
 - (7) 1925. Zum Nachweis der Lipide in Zelle und Gewebe. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 97*, p. 187*.
 - (8) 1926. Zur Chemie der Desinfektion und über Beziehungen zwischen chemischen Konstitution und pharmakologischer Wirkung. Zugleich ein Beitrag zur Vitalfärbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 98*, p. 67.
 - (9) 1926. Zur Gramschen Färbung. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 98*, p. 104.
 - (10) 1928. Das Ektoplasma der Bakterien. Zur Gramschen Färbung.

- zum kern der Bakterien und zur Chemie der Desinfektion. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 107*, p. 161.
- (11) 1928. Das Ektoplasma der Hefezelle. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Zellmembran und der Kittsubstanz der Hefezelle. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 108*, p. 193.
- (12) 1928. Zur Gramschen Färbung. Ueber die chemische Zusammensetzung der Lipoidsäure und über Künstlich grampositiv gemachte Hefezellen. *Zentr. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 109*, p. 181.
- SHEPPE (M. D.) and CONSTABLE (M. G.). 1923. An unsuspected source of error in the Gram stain. *Jour. Lab. and Clin. Med.*, 8, p. 757.
- SIMONINI (A.). 1914. Ueber die Wirkung seltener Erden auf Bakterien. *Zentr. f. Bak., 1 Abt., Orig., 74*, p. 343.
- SMITH (H. W.). 1922. The biochemical differentiation of Bacteria. *Amer. Jour. Hyg.*, 2, p. 607.
- SNYDER (W. H.). 1912. A simplified Gram technique. *Arch. of Ophthalm.*, 41, p. 599.
- SOLARINO (G.). 1930. Recherches sur la gram-résistance des germes. *Soc. Intern. di Microbiol., Boll. della Sezione Italiana. Vol. 2, Fasc. 4*, p. 77. *Zentr. f. Bakt., II Abt., 1931*, 82, p. 129.
- STEARN (E. W.) and STEARN (A. E.).
- (1) 1923. The mechanical behavior of dyes, especially gentian violet, in bacteriological media. *Jour. of Bacter.*, 8, p. 567.
- (2) 1924. The chemical mechanism of bacterial behavior.
- I) Behavior toward dyes. Factors controlling the Gram reaction. *Jour. of Bacter.*, 9, p. 463.
- (3) II) A new theorie of the Gram reaction. *Jour. of Bacter.*, 9, p. 479.
- (4) III) The problem of bacteriostasis. *Jour. of Bacter.*, 9, p. 491.
- (5) 1925. A study of the chemical differentiation of Bacteria. *Jour. of Bacter.*, 10, p. 13.
- (6) 1926. Conditions and reactions defining dye bacteriostasis. *Jour. of Bacter.*, 11, p. 345.
- (7) 1928. Studies in the physicochemical behavior of Bacteria. *Univ. Mo. Studies*, 3, n° 2, p. 1-84.
- (8) 1930. The nature of the Gram compound and its bearing on the mechanism of staining. *Jour. of Bacter.*, 20, p. 287.
- STEARN (E. W.). 1927. The correlation of variation in dye sensivity and Gram character in certain gram-positive organisms. *Jour. of Bacter.*, 14, p. 349.
- STEARN (A. E.). 1930. Compound formation of crystal violet with nucleic acid and gelatin and its significance in dye bacteriostasis. *Jour. of Bacter.*, 19, p. 133.
- TAMURA (S.). 1914. Zur Chemie der Bakterien. *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, 89, p. 291.
- TROMMSDORFF (R.). 1902. Ueber die Beziehung der Gramschen Färbung zu chemischen Vorgängen in der abgetöten Hefezelle. *Zentr. f. Bakter., II Abt.*, p. 8.

UNNA (P. G.).

(1) 1887. Die Rosaniline und Parasosaniline. Eine bakteriologische Farbenstudie. *Monatsch. f. prakt. Dermatol., Suppl.* 6.

(2) 1888. Die Entwicklung der Bakterienfärbung. *Zentr. f. Bakt., III Bd.*, p. 22 et suivantes.

VIERLING (K.). 1922. Zum Ersatz der Lugolschen Lösung bei der Gram-Färbung. *Zentr. f. Bakt., I Abt.*, 88, p. 169.

WILDE. 1896. Ueber den *Bacillus pneumoniae* Friedländers und verwandte Bakterien. *Inaug. diss. Bonn.*

ZIMMERMANN. 1890. Die Bakterien unterer Trinkund Nutzwässer. *I. Reihe. Chemnitz.*

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	9
PLAN	12

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE DE LA REACTION DE GRAM

Chapitre Premier. — Modifications à la technique primitive de GRAM	13
1) Etallement. Fixation	14
2) Le colorant.	
<i>a</i> : Nature chimique du colorant	14
<i>b</i> : Mise en solution du colorant	15
3) La solution iodo-iodurée	19
4) Les agents de différenciation	21
5) La contre-coloration	23
 Chapitre II. — Limites de la spécificité de la Réaction de GRAM. Le « Gram-Daüer » de NEIDE .	 25
 Chapitre III. — Perte de la propriété de prendre le Gram	 26
1) Vieillessement des cultures	26
2) Autolyse des suspensions microbiennes conservées aseptiquement	28
3) Cultures en présence de substances dysgénésiques	29
4) Abaissement de la tension superficielle des milieux de culture	30
5) Changement d'habitat	30
6) Traitements chimiques :	
<i>a</i> : Action des ferments protéolytiques	31
<i>b</i> : Action des alcalis et des acides	31
<i>c</i> : Action des solvants des lipides	32

Chapitre IV. Théories de la Réaction de GRAM 33

I) Théories physiques :

A) Théorie granulaire de FISCHER	33
B) Théorie de la perméabilité.	
1) Travaux de FISCHER	34
2) Travaux de BRUDNY	34
3) Travaux de BENJANS	35
4) Travaux de BURKE et de ses collaborateurs	36
C) Critiques des théories physiques	37
D) Travaux récents des KAPLAN	38

II) Théories chimiques :

A) Théorie de UNNA	41
B) Théorie de DEUSSEN	41
C) Théories attribuant aux glycérides le rôle de substance gramophile :	
1) Travaux de SCHMIDT	43
2) Travaux de DREYER, SCOTT et WALKER	43
3) Travaux de REICHERT	43
4) Travaux de TAMURA	43
5) Critiques apportées à ces conceptions	43
D) Théories attribuant à des lipides plus complexes le rôle de substance gramophile	45
1) Travaux de GUERBET, MAYER et SCHAEFFER	45
2) Travaux de EISENBERG	45
3) Travaux de JOBLING et PATERSON	45
4) Travaux de KENDALL	45
5) Travaux de GUTSTEIN	46
6) Travaux de SCHUMACHER	46

III) Théorie physico-chimique de STEARN et STEARN. 49

A) Exposé de la théorie	49
B) Critiques de BURKE et BARNES	51

Chapitre V. — Le siège de la Réaction de GRAM 52

I) L'ectoplasme de EISENBERG	52
II) Le rôle de l'ectoplasme d'après GUTSTEIN	53
III) Critiques de SCHUMACHER à la théorie de GUTSTEIN	54
Théorie de l'endoplasme de SCHUMACHER	54
IV) Recherches de KEMP	56
V) Le « cortex » gram-positif de CHURCHMAN	56

DEUXIEME PARTIE

EXPOSE DES RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre Premier. -- Nécessité d'une étude quantitative. Importance des travaux de NEIDE	57
Chapitre II. -- Etablissement de la technique d'expérimentation	62
1) Matériel d'étude	62
2) Préparation des émulsions	63
3) Préparation des étalements	63
4) Colorant. Solution iodo-iodurée. Décolorant	64
5) Appréciation de la décoloration	66
6) Modifications successives apportées	67
7) Technique définitive d'expérimentation	72
Chapitre III. -- Etude de la progression de la décoloration.	74
Chapitre IV. — Etude de l'influence de l'agent fixateur sur la résistance à la décoloration	78
1) Historique	78
2) Fixateurs utilisés	80
3) Technique d'expérimentation	82
4) Résultats	82
5) Conclusion	86
Chapitre V. — Etude de l'influence de l'âge des cellules sur leur résistance à la décoloration	90
I) <i>Etude sur des cellules de Levure</i>	90
A) Technique d'expérimentation	90
B) Résultats	91
C) Conclusion	95
II) <i>Etude sur des Bactéries</i>	98
A) Technique d'expérimentation	98
B) Résultats	99
C) Conclusion	101
Chapitre VI. — Etude de l'influence de la nature du milieu de culture	103

Chapitre VII. — Etude de l'influence des principaux constituants cellulaires (lipides, nucléoprotides, lipoprotides) sur la résistance à la décoloration	105
I) Technique d'expérimentation	106
II) Etude de la décoloration des cellules utilisées	107
III) Etude de leur décoloration après soustraction des lipides libres	107
IV) Etude de leur décoloration après soustraction des lipides libres et des nucléoprotides	109
V) Etude de leur décoloration après soustraction des lipides libres, des nucléoprotides et des lipoprotides	111
VI) Conclusion	113
Chapitre VIII. — Conclusion des recherches personnelles	114

TROISIEME PARTIE

CONCLUSION GENERALE	120
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	124
TABLE DES MATIÈRES	131

